

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）



出願人代理人

北村 欣一

殿

あて名

〒 105-0004

東京都港区新橋 2-16-1  
ニュー新橋ビル 703

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨  
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)  
[PCT規則44.1]

発送日  
(日.月.年)

05.09.00

出願人又は代理人  
の書類記号

20622

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/JPO0/03388

国際出願日  
(日.月.年)

26.05.00

出願人（氏名又は名称）

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長が代表する日本国

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

PCT19条の規定に基づき補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる（PCT規則46参照）。

いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。

どこへ 直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland  
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項（PCT17条(2)(a)）の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

3. ☐ 法施行規則第44条（PCT規則40.2）に規定する追加手数料の納付に対する異議の中立てに関して、出願人に下記の点を通知する。

☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。

☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。

優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から30月まで（官庁によってはもっと遅く）国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JJP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特許庁長官

4N 9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

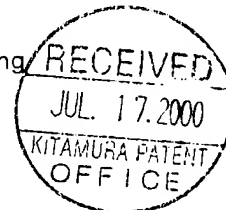
NOTIFICATION OF RECEIPT OF  
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KITAMURA, Kinichi  
703, New Shinbashi Building  
16-1, Shinbashi 2-chome  
Minato-ku  
Tokyo 105-0004  
JAPON



<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 28 June 2000 (28.06.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
<b>Applicant's or agent's file reference</b> 20622	<b>International application No.</b> PCT/JP00/03388

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF SERICULTURAL  
AND ENTOMOLOGICAL SCIENCE, MINISTRY OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES  
(for all designated States except US)

KOTAKI, Toyomi et al (for US)

International filing date : 26 May 2000 (26.05.00)  
Priority date(s) claimed : 31 May 1999 (31.05.99)  
22 March 2000 (22.03.00)

Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau : 09 June 2000 (09.06.00)

List of designated Offices :

EP : DE,FR,GB  
National : CA,US

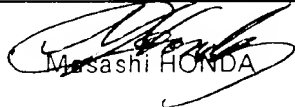
## ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:  Masashi HONDA</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---

## INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. **It is the applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

**For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.**

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

## CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

## REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 2 0 6 2 2	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0 ) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 3 3 8 8	国際出願日 (日.月.年) 2 6 . 0 5 . 0 0	優先日 (日.月.年) 3 1 . 0 5 . 9 9
出願人 (氏名又は名称) 農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所が代表する日本国		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 ( P C T 1 8 条 ) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 ( P C T 規則38.2(b) ) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## 注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。
3. 文献の写しの請求について

国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

### 〔申込方法〕

(1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

### 〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル

財団法人 日本特許情報機構 サービス課

TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

## 様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

### PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

#### 補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続において請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

#### いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

#### 補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合については、以下を参照すること。

#### どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直さなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

#### 補正書にどのような書簡を添付しなければならないか

##### 書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(i)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(i)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲と関連して表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。

次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :  
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :  
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :  
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は  
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :  
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならず、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならない。見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/ISA/401)の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。

Certificate of Translation

I, Kiyoshi Kawakubo, of 4-18, Fujiwara 5, Funabashi-shi, Chiba-ken, Japan hereby certify that I am the translator of the below-listed documents and certify that the attached hereto are true and correct translations to the best of my knowledge and belief.

Attached:

- a) Certificate by Mr. Naoki Katsura
- b) Law on National Institute of Agrobiological Sciences
- c) Section 35, Sub-Section 1, Paragraph 3 of  
the Government Ordinance No. 326 of 2000
- d) Commercial Register

  
Kiyoshi Kawakubo

Dated this 13th day of July, 2001



(Partial Translation)

Section 35, Sub-Section 1, Paragraph 3 of  
the Government Ordinance No. 326 of 2000

Section 35, Sub-Section 1

The rights and obligations defined by the Government Ordinance as stipulated by the stipulations listed in the first column of Table I in Separate List II shall be the rights and obligations as listed hereinbelow.

Para. 1. (omitted)

Para. 2. The rights and obligations relating to articles actually in use by the Departments or Organisations listed in the second column of Table 1 at the time of establishment of the Independent Administrative Entity listed in the fourth column of Table I in Separate List II.

Para. 3. Among the rights and obligations owned by the state of Japan relating to the business of Independent Administrative Entity listed in the fourth column of Table I in Separate List II, those rights and obligations which are other than those listed in the preceding Para. 2 and which are designated by the Minister listed in the third column of the List.

\*\*\*\*\*

(Translation of Table 1, only related portions as referred to above)

Table 1

First column: Law on National Institute of Agrobiological Science<sup>s</sup>, Additional Rules Section 5, Sub-Section 1

Second column 2: National Institute of Agrobiological Science and National Institute of Sericultural and Entomological Science

Third column: Minister of Agriculture and Fisheries

Fourth column: National Institute of Agrobiological Sciences

○独立行政法人通則法等の施行に伴う関係政令の整備及び経過措置に関する政令 抄  
(平成十二年六月七日)  
(政令第三百二十六号)

独立行政法人通則法等の施行に伴う関係政令の整備及び経過措置に関する政令をここに公布する。

独立行政法人通則法等の施行に伴う関係政令の整備及び経過措置に関する政令  
内閣は、独立行政法人通則法(平成十一年法律第百三号)、独立行政法人通則法の施行に伴う関係法律の整備に関する法律(平成十一年法律第百四号)及び関係法律の規定に基づき、この政令を制定する。

目次

第一章 関係政令の整備(第一条―第三十二条)

第二章 経過措置(第三十三条―第四十四条)

附則

第二章 経過措置

(中央労働委員会の委員の任命手続に関する経過措置)

第三十三条 内閣総理大臣は、独立行政法人通則法の施行に伴う関係法律の整備に関する法律(次項において「整備法」という。)附則第二条第三項の規定により使用者委員及び労働者委員の候補者の推薦を求めるときは、その旨及び推薦に係る手続その他必要な事項を官報で公告するものとする。

2 労働組合は、整備法附則第二条第三項の規定により労働者委員の候補者を推薦するとき、当該労働組合が労働組合法(昭和二十四年法律第百七十四号)第二条及び第五条第二項の規定に適合する旨の中央労働委員会の証明書を添えなければならない。

(職員の引継ぎに係る政令で定める部局又は機関)

第三十四条 別表第一の上欄に掲げる規定に規定する政令で定める部局又は機関は、同表の下欄に掲げる部局又は機関とする。

(各独立行政法人の成立の時に於いて承継される権利及び義務等)

第三十五条 別表第二の表一の第一欄に掲げる規定に規定する政令で定める権利及び義務は、次に掲げる権利及び義務とする。

一 別表第二の表一の第二欄に掲げる部局又は機関の所属に属する土地、建物、工作物、船舶及び航空機(その土地に定着する物及びその建物に附属する工作物を含む。以下この条及び次条において「土地等」という。)のうち同表の第三欄に掲げる大臣が財務大臣に協議して指定するもの(財務省の醸造研究所の所属に属する土地等にあつては、財務大臣が指定するもの)に関する権利及び義務

二 別表第二の表一の第四欄に掲げる独立行政法人の成立の際現に同表の第二欄に掲げる部局又は機関に使用されている物品に関する権利及び義務

三 別表第二の表一の第四欄に掲げる独立行政法人の業務に関し国が有する権利及び義務のうち前二号に掲げるもの以外のものであつて、同表の第三欄に掲げる大臣が指定するもの

2 別表第二の表二の第一欄に掲げる規定に規定する政令で定める権利及び義務は、次に掲げる権利及び義務とする。

一 別表第二の表二の第二欄に掲げる独立行政法人の成立の際現に同表の第三欄に掲げる部局又は機関に使用されている物品に関する権利及び義務

二 別表第二の表二の第二欄に掲げる独立行政法人の業務に関し現に国が有する権利及び義務のうち前号に掲げるもの以外のものであつて、同表の第四欄に掲げる大臣が指定するもの

3 別表第二の表三の第一欄に掲げる規定に規定する政令で定める権利及び義務は、次に掲げる権利及び義務とする。

一 別表第二の表三の第二欄に掲げる部局又は機関の所属に属する土地等のうち同表の第三欄に掲げる大臣が財務大臣に協議して指定するものに関する権利及び義務

二 別表第二の表三の第四欄に掲げる独立行政法人の成立の際現に同表の第二欄に掲げる部局又は機関に使用されている物品のうち同表の第三欄に掲げる大臣が指定するものに関する権利及び義務

三 別表第二の表三の第四欄に掲げる独立行政法人の業務に関し国が有する権利及び義務のうち前二号に掲げるもの以外のものであつて、同表の第三欄に掲げる大臣が指定するもの

4 別表第二の表四の上欄に掲げる規定に規定する政令で定める権利及び義務は、次に掲げる権利及び義務とする。

一 別表第二の表四の中欄に掲げる独立行政法人の成立の際現に同表の下欄に掲げる部局又は機関に使用されている物品のうち経済産業大臣が指定するものに関する権利及び義務

二 別表第二の表四の中欄に掲げる独立行政法人の業務に関し国が有する権利及び義務のうち前号に掲げるもの以外のものであつて、経済産業大臣が指定するもの

5 貿易保険法の一部を改正する法律(平成十一年法律第二百二号。以下「貿易保険法一部改

独立行政法人国立 美術館法附則第五 条第一項	文部科学省の国立 近代美術館、国立 西洋美術館及び国 立国際美術館	文部科学大臣	独立行政法人国立 美術館	同条第二項
独立行政法人国立 博物館法附則第五 条第一項	文部科学省の国立 博物館	文部科学大臣	独立行政法人国立 博物館	同条第二項
独立行政法人文化 財研究所法附則第 五条第一項	文部科学省の国立 文化財研究所	文部科学大臣	独立行政法人文化 財研究所	同条第二項
独立行政法人産業 医学総合研究所法 附則第五条第一項	厚生労働省の産業 医学総合研究所	厚生労働大臣	独立行政法人産業 医学総合研究所	同条第二項
独立行政法人農林 水産消費技術セン ター法附則第五条 第一項	農林水産省の農林 水産消費技術セン ター	農林水産大臣	独立行政法人農林 水産消費技術セン ター	同条第二項
独立行政法人種苗 管理センター法附 則第五条第一項	農林水産省の種苗 管理センター	農林水産大臣	独立行政法人種苗 管理センター	同条第二項
独立行政法人家畜 改良センター法附 則第五条第一項	農林水産省の家畜 改良センター	農林水産大臣	独立行政法人家畜 改良センター	同条第二項
独立行政法人肥飼 料検査所法附則第 五条第一項	農林水産省の肥飼 料検査所	農林水産大臣	独立行政法人肥飼 料検査所	同条第二項
独立行政法人農薬 検査所法附則第五 条第一項	農林水産省の農薬 検査所	農林水産大臣	独立行政法人農薬 検査所	同条第二項
独立行政法人農業 者大学校法附則第 五条第一項	農林水産省の農業 者大学校	農林水産大臣	独立行政法人農業 者大学校	同条第二項
独立行政法人林木 育種センター法附 則第五条第一項	農林水産省の林木 育種センター	農林水産大臣	独立行政法人林木 育種センター	同条第二項
独立行政法人さ け・ます資源管理 センター法附則第 五条第一項	農林水産省のさ け・ます資源管理 センター	農林水産大臣	独立行政法人さ け・ます資源管理 センター	同条第二項
独立行政法人水産 大学校法附則第五 条第一項	農林水産省の水産 大学校	農林水産大臣	独立行政法人水産 大学校	同条第二項
独立行政法人農業 技術研究機構法附 則第五条第一項	農林水産省の農業 研究センター、野 菜・茶業試験場、 果樹試験場、畜産 試験場、草地試験 場、家畜衛生試験 場及び農業試験場	農林水産大臣	独立行政法人農業 技術研究機構	同条第二項
独立行政法人農業 生物資源研究所法 附則第五条第一項	農林水産省の農業 生物資源研究所及 び蚕糸・昆虫農業 技術研究所	農林水産大臣	独立行政法人農業 生物資源研究所	同条第二項

(Partial translation)

Commercial Register

Name: National Institute of Agrobiological Sciences

Main Office Address: 1-2, Kannondai 2-chome, Tsukuba-shi,  
Ibaraki-ken

Officer: Managing Director, Naoki Katsura of  
1144-209, ooaza Yatabe, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken

Date of Establishment: April 1, 2001

Capital: JPY 40,319,066,059



(通一)名称 独立行政法人農業生物資源研究

その他の事項  
資本金 金40,319,066,059円

田舎部20

申請人印

目的一覽  
予備欄

丁 1

登記番号

4-1-1



I

(Translation)

## CERTIFICATE

I certify that the following is true:

A { that the patent rights, the rights to obtain patents, the rights of registered utility models, the rights to obtain utility model registrations, the trademark rights, and the rights originated by the application of trademark registrations, which are designated by the Minister of Agriculture and Fisheries on March 15, 2001 as the rights and obligations to be succeeded from the state of Japan to the National Institute of Agrobiological Science as an Independent Administrative Entity, the succession being effected by the stipulations under Section 35, Sub-Section 1, Paragraph 3 of the Government Ordinance (Gov. Ord. No. 326 of 2000) relating to the reorganization of the related Government Ordinances and the interim measures accompanied by the enforcement of general rules relating to the Independent Administrative Juridical Persons, etc., relate B  
C { to (or are concerned with) the Director General of the National Institute of Agrobiological Science and the Director General of the National Institute of Sericulture and Entomological Science, both of Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.

a)

National Institute of Agrobiological Sciences  
Managing Director

Naoki Katsura (seal)

Date:



(Partial Translation)

Law on National Institute  
of Agrobiological Sciences

(Scope of Business)

Section 10. The Institute shall perform the following business to attain the purpose of Section 3.

1. The Institute shall perform the business of basic technical searches, studies, related analyses, giving expert opinions and lectures on agricultural development and utilization of biological resources.

2. The Institute shall perform the business of basic technical searches, studies, related analyses, giving expert opinions and lectures on agricultural development and utilization of insects and other invertebrate animals (exclusive of honey bees).

3. - 6. (omitted)

\*\*\*\*\*

Additional Rules

(Succession, etc. of Rights and Obligations)

Section 5, Sub-Section 1

At the time of establishment of the Institute, regarding the business stipulated in Section 10, the rights and obligations stipulated by the Government Ordinance among the rights and obligations owned by the state of Japan shall be succeeded by the Institute when it is established.

.(Partial Translation)

Section 35, Sub-Section 1, Paragraph 3 of  
the Government Ordinance No. 326 of 2000

Section 35, Sub-Section 1

The rights and obligations defined by the Government Ordinance as stipulated by the stipulations listed in the first column of Table I in Separate List II shall be the rights and obligations as listed hereinbelow.

Para. 1. (omitted)

Para. 2. The rights and obligations relating to articles actually in use by the Departments or Organisations listed in the second column of Table 1 at the time of establishment of the Independent Administrative Entity listed in the fourth column of Table I in Separate List II.

Para. 3. Among the rights and obligations owned by the state of Japan relating to the business of Independent Administrative Entity listed in the fourth column of Table I in Separate List II, those rights and obligations which are other than those listed in the preceding Para. 2 and which are designated by the Minister listed in the third column of the List.

\*\*\*\*\*

(Translation of Table 1, only related portions as referred to above)

Table 1

First column: Law on National Institute of Agrobiological Sciences<sup>S</sup>, Additional Rules Section 5, Sub-Section 1

Second column 2: National Institute of Agrobiological Sciences and National Institute of Sericultural and Entomological Science

Third column: Minister of Agriculture and Fisheries

Fourth column: National Institute of Agrobiological Sciences<sup>S</sup>

.(Partial translation)

Commercial Register

Name: National Institute of Agrobiological Sciences

Main Office Address: 1-2, Kannondai 2-chome, Tsukuba-shi,  
Ibaraki-ken

Officer: Managing Director, Naoki Katsura of  
1144-209, ooaza Yatabe, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken

Date of Establishment: April 1, 2001

Capital: JPY 40,319,066,059

V

Certificate of Translation

I, Kiyoshi Kawakubo, of 4-18, Fujiwara 5, Funabashi-shi, Chiba-ken, Japan hereby certify that I am the translator of the below-listed documents and certify that the attached hereto are true and correct translations to the best of my knowledge and belief.

Attached:

- a) Certificate by Mr. Naoki Katsura
- b) Law on National Institute of Agrobiological Sciences
- c) Section 35, Sub-Section 1, Paragraph 3 of  
the Government Ordinance No. 326 of 2000
- d) Commercial Register

\_\_\_\_\_  
Kiyoshi Kawakubo

Dated this            day of            , 2001

(Translation)

## CERTIFICATE

I certify that the following is true:

that the patent rights, the rights to obtain patents, the rights of registered utility models, the rights to obtain utility model registrations, the trademark rights, and the rights originated by the application of trademark registrations, which are designated by the Minister of Agriculture and Fisheries on March 15, 2001 as the rights and obligations to be succeeded from the state of Japan to the National Institute of Agrobiological Science as an Independent Administrative Entity, the succession being effected by the stipulations under Section 35, Sub-Section 1, Paragraph 3 of the Government Ordinance (Gov. Ord. No. 326 of 2000) relating to the reorganization of the related Government Ordinances and the interim measures accompanied by the enforcement of general rules relating to the Independent Administrative Juridical Persons, etc., relate to (or are concerned with) the Director General of the National Institute of Agrobiological Science and the Director General of the National Institute of Sericulture and Entomological Science, both of Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.

National Institute of Agrobiological Sciences  
Managing Director

Naoki Katsura (seal)

Date: July 10, 2001

# 証 明 書

平成 13 年 7 月 10 日

独立行政法人農業生物資源研究所

理 事 長 桂 直 樹



独立行政法人通則法等の施行に伴う関係政令の整備及び経過措置に関する政令（平成 12 年政令第 326 号）第 35 条第 1 項第 3 号の規定に基づき、国から独立行政法人農業生物資源研究所へ承継する権利及び義務として、平成 13 年 3 月 15 日に農林水産大臣が指定した特許権、特許を受ける権利、実用新案権、実用新案登録を受ける権利、商標権、商標登録出願により生じた権利は、すべて農林水産省の農業生物資源研究所長及び蚕糸・昆虫農業技術研究所長に係るものであることに相違ありません。

(Partial Translation)

Law on National Institute  
of Agrobiological Sciences

(Scope of Business)

Section 10. The Institute shall perform the following business to attain the purpose of Section 3.

1. The Institute shall perform the business of basic technical searches, studies, related analyses, giving expert opinions and lectures on agricultural development and utilization of biological resources.

2. The Institute shall perform the business of basic technical searches, studies, related analyses, giving expert opinions and lectures on agricultural development and utilization of insects and other invertebrate animals (exclusive of honey bees).

3. - 6. (omitted)

\*\*\*\*\*

Additional Rules

(Succession, etc. of Rights and Obligations)

Section 5, Sub-Section 1

At the time of establishment of the Institute, regarding the business stipulated in Section 10, the rights and obligations stipulated by the Government Ordinance among the rights and obligations owned by the state of Japan shall be succeeded by the Institute when it is established.

## 独立行政法人個別法案

## 独立行政法人農業生物資源研究所法

## 目次

- 第一章 総則（第一条－第六条）
- 第二章 役員（第七条－第九条）
- 第三章 業務等（第十条・第十一条）
- 第四章 雑則（第十二条）
- 第五章 罰則（第十三条）
- 附則

## 第一章 総則

## （目的）

第一条 この法律は、独立行政法人農業生物資源研究所の名称、目的、業務の範囲等に関する事項を定めることを目的とする。

## （名称）

第二条 この法律及び独立行政法人通則法（平成十一年法律第百三号。以下「通則法」という。）の定めるところにより設立される通則法第二条第一項に規定する独立行政法人の名称は、独立行政法人農業生物資源研究所とする。

## （研究所の目的）

第三条 独立行政法人農業生物資源研究所（以下「研究所」という。）は、生物資源の農業上の開発及び利用に関する技術上の基礎的な調査及び研究、昆虫その他の無脊椎動物の農業上の利用に関する技術上の試験及び研究等を行うことにより、生物の農業上の利用に関する技術の向上に寄与することを目的とする。

## （特定独立行政法人）

第四条 研究所は、通則法第二条第二項に規定する特定独立行政法人とする。

## （事務所）

第五条 研究所は、主たる事務所を茨城県に置く。

## （資本金）

第六条 研究所の資本金は、附則第五条第二項の規定により政府から出資があったものとされた金額とする。

- 2 政府は、必要があると認めるときは、予算で定める金額の範囲内において、研究所に追加して出資することができる。
- 3 研究所は、前項の規定による政府の出資があったときは、その出資額により資本金を増加するものとする。

## 第二章 役員

## （役員）

第七条 研究所に、役員として、その長である理事長及び監事二人を置く。

- 2 研究所に、役員として、理事二人以内を置くことができる。

## （理事の職務及び権限等）

第八条 理事は、理事長の定めるところにより、理事長を補佐して研究所の業務を掌理する。

- 2 通則法第十九条第二項の個別法で定める役員は、理事とする。ただし、理事が置かれていないときは、監事とする。
- 3 前項ただし書の場合において、通則法第十九条第二項の規定により理事長の職務を代理し又はその職務を行う監事は、その間、監事の職務を行ってはならない。

## （役員の任期）

第九条 理事長の任期は四年とし、理事及び監事の任期は二年とする。

## 第三章 業務等

## （業務の範囲）

第十条 研究所は、第三条の目的を達成するため、次の業務を行う。

- 一 生物資源の農業上の開発及び利用に関する技術上の基礎的な調査及び研究並びにこれに関連する分析、鑑定及び講習を行うこと。



- 二 昆虫その他の無脊椎動物（みつばちを除く。）の農業上の利用に関する技術上の試験及び研究、調査、分析、鑑定並びに講習を行うこと（次号に掲げるものを除く。）。
  - 三 蚕糸に関する技術上の試験及び研究、調査、分析、鑑定並びに講習を行うこと。
  - 四 原蚕種並びに桑の接穂及び苗木の生産及び配布を行うこと。
  - 五 農作物の品種改良のための放射線の利用に関する試験及び研究を行うこと。
  - 六 前各号の業務に附帯する業務を行うこと。
- 2 研究所は、前項の業務のほか、同項の業務の遂行に支障のない範囲内で、林木の品種改良のための放射線の利用に関する試験及び研究を行うことができる。

（積立金の処分）

第十一条 研究所は、通則法第二十九条第二項第一号に規定する中期目標の期間（以下この項において「中期目標の期間」という。）の最後の事業年度に係る通則法第四十四条第一項又は第二項の規定による整理を行った後、同条第一項の規定による積立金があるときは、その額に相当する金額のうち農林水産大臣の承認を受けた金額を、当該中期目標の期間の次の中期目標の期間に係る通則法第三十条第一項の認可を受けた中期計画（同項後段の規定による変更の認可を受けたときは、その変更後のもの）の定めるところにより、当該次の中期目標の期間における前条に規定する業務の財源に充てることができる。

- 2 農林水産大臣は、前項の規定による承認をしようとするときは、あらかじめ、農林水産省の独立行政法人評価委員会の意見を聴くとともに、財務大臣に協議しなければならない。
- 3 研究所は、第一項に規定する積立金の額に相当する金額から同項の規定による承認を受けた金額を控除してなお残余があるときは、その残余の額を国庫に納付しなければならない。
- 4 前三項に定めるもののほか、納付金の納付の手続その他積立金の処分に關し必要な事項は、政令で定める。

第四章 雑則

（主務大臣等）

第十二条 研究所に係る通則法における主務大臣、主務省及び主務省令は、それぞれ農林水産大臣、農林水産省及び農林水産省令とする。

第五章 罰則

第十三条 次の各号のいずれかに該当する場合には、その違反行為をした研究所の役員は、二十万円以下の過料に処する。

- 一 第十条に規定する業務以外の業務を行ったとき。
- 二 第十一条第一項の規定により農林水産大臣の承認を受けなければならない場合において、その承認を受けなかったとき。

附 則

（施行期日）

第一条 この法律は、平成十三年一月六日から施行する。ただし、附則第七条の規定は、同日から起算して六月を超えない範囲内において政令で定める日から施行する。

（職員の引継ぎ等）

第二条 研究所の成立の際現に農林水産省の部局又は機関で政令で定めるものの職員である者は、別に辞令を発せられない限り、研究所の成立の日において、研究所の相当の職員となるものとする。

第三条 研究所の成立の際現に前条に規定する政令で定める部局又は機関の職員である者のうち、研究所の成立の日において引き続き研究所の職員となったもの（次条において「引継職員」という。）であって、研究所の成立の日において農林水産大臣又はその委任を受けた者から児童手当法（昭和四十六年法律第七十三号）第七条第一項（同法附則第六条第二項において準用する場合を含む。以下この条において同じ。）の規定による認定を受けているものが、研究所の成立の日において児童手当又は同法附則第六条第一項の給付（以下この条において「特例給付」という。）の支給要件に該当するときは、その者に対する児童手当又は特例給付の支給に関しては、研究所の成立の日において同法第七条第一項の規定による市町村長（特別区の区長を含む。）の認定があったものとみなす。この場合において、その認定があったものとみなされた児童手当又は特例給付の支給は、同法第八条第二項（同法附則第六条第二項において準用する場合を含む。）の規定にかかわらず、研究所の成立の日の前日の属する月の翌月から始める。

（研究所の職員となる者の職員団体についての経過措置）

第四条 研究所の成立の際現に存する国家公務員法（昭和二十二年法律第二十号）第百八条の二第一項に規定する職員団体であって、その構成員の過半数が引継職員であるものは、研究所の成立の際国営企業及び特定独立行政法人の労働関係に関する法律（昭和二十三年法律第二百五十七号）の適用を受ける労働組合となるものとする。この場合において、当該職員団体が法人であるときは、法人である労働組合となるものとする。

- 2 前項の規定により法人である労働組合となったものは、研究所の成立の日から起算して六十日を経過する日までに、労働組合法（昭和二十四年法律第七十四号）第二条及び第五条第二項の規定に適合する旨の労働委員会の証明を受け、かつ、その主たる事務所の所在地において登記しなければ、その日の経過により解散するものとする。

- 3 第一項の規定により労働組合となったものについては、研究所の成立の日から起算して六十日を経過する日までは、労働組合法第二条ただし書（第一号に係る部分に限る。）の規定は、適用しない。

（権利義務の承継等）

第五条 研究所の成立の際、第十条に規定する業務に関し、現に国が有する権利及び義務のうち政令で定めるものは、研究所の成立の時にいて研究所が承継する。

- 2 前項の規定により研究所が国の有する権利及び義務を承継したときは、その承継の際、承継される権利に係る土地、建物その他の財産で政令で定めるものの価額の合計額に相当する金額は、政府から研究所に対し出資されたものとする。

- 3 前項の規定により政府から出資があったものとされる同項の財産の価額は、研究所の成立の日現在における時価を基準として評価委員が評価した価額とする。

- 4 前項の評価委員その他評価に関し必要な事項は、政令で定める。

（政令への委任）

第六条 附則第二条から前条までに定めるもののほか、研究所の設立に伴い必要な経過措置その他この法律の施行に関し必要な経過措置は、政令で定める。

（農林水産省設置法の一部改正）

第七条 農林水産省設置法（平成十一年法律第九十八号）の一部を次のように改正する。

第十三条第五号の二中「独立行政法人農業技術研究機構」を「次に掲げる独立行政法人」に改め、同号に次のように加える。

- イ 独立行政法人農業技術研究機構
- ロ 独立行政法人農業生物資源研究所

## 明細書

遺伝子 Any-RF、休眠制御物質およびその製造方法、  
ならびに生体細胞の細胞制御剤

## 技術分野

本発明は、遺伝子 Any-RF、休眠制御物質およびその製造方法、ならびに生体細胞の細胞制御剤に関し、特に、前幼虫形態を取る昆虫由来の、休眠制御活性および生体細胞制御機能を有する遺伝子 Any-RF、休眠制御物質およびその製造方法、ならびにガン細胞増殖制御剤に関するものである。本明細書では、本発明において単離・精製した特定のタンパク質をコードする遺伝子を「Any-RF」と命名し、以下必要に応じ、「遺伝子 Any-RF」と略称する。

## 背景技術

従来、昆虫由来の休眠制御活性を有する遺伝子について、また、かかる遺伝子が生体細胞制御機能をも有することについては、何ら知られていない。以下、本発明の理解を容易にするために、休眠制御活性および生体細胞制御機能に関する周辺の技術について述べる。

地球上には 100 万種ともいわれる程の<sup>多</sup>他種類で多様な昆虫があらゆる環境で強かに、そして力強く生息している。昆虫は、熱帯から、温帯、針葉樹林、氷雪地、砂漠、さらには湖沼地に至る地球のほぼ全域の環境に適応しながら生存している。こうした現象は、昆虫があらゆる環境の中で強かに生き、あるいは生き残るべく多様な機能特性を獲得しているからに他ならない。我々が昆虫世界から学ぶべきものは多い。昆虫の機能特性としては、例えば、生体防御機構や、成長・発育制御機構、広範な天然・合成の化学物質の分解能、生産機能、鋭い感覚機能、行動調節機構、脳・神経機構、媒介機能、あるいは環境適応能などを挙げることができる。

こうした昆虫が持つ環境適応的でかつ省エネルギー的な機能を解析することにより、将来的には、最先端の創造的な新しいテクノロジー構築に役立つ貴重な情報が得られる。また、昆虫の持つ機能を解析して、昆虫由来で多様な機能性を持つ生理活性物質を高度に利用する技術を開発することは、人類にとっても重要な意義がある。昆虫から単離し、そして構造決定した生理活性物質は、農業分野や医薬品分野で、高品質のかつ新規な製品を開発するための応用研究の対象としても重要な意義を持っている。

最初に、昆虫の休眠制御機能について述べる。

昆虫が持つ多様な機能特性の中でも特に昆虫の休眠機能は、見事な環境適応現象として特記すべき機能の一つであるといえる。昆虫の休眠を科学する意義は次の通りである。(1) 休眠は、生物が成長を進める過程で完全に発育を停止する現象であり、予期しない高温・低温・食物不足のような悪環境を乗り切るためのエネルギー節約型の生命現象であると捉えることができる。(2) 休眠は、生息環境が発育・成長に悪影響を与える前に、遺伝的に制御するか、または環境情報を解読して、事前に発育を停止するものであり、単なる発育停止とは異なる積極的な環境適応戦略であるといえる。(3) 休眠を制御することが可能となれば、害虫防除や作物種子の発芽促進の重要な実用技術となり、農業分野での応用技術となり得る。

従って、昆虫の休眠制御の機序が明らかとなり、また休眠制御物質の構造が決定され、その機能が解明できれば、これを生物産業分野に応用することができる。すなわち、人間生活にとって有用な生物の発育・成長を自在に制御することが可能となり、また有害な生物の活動を停止させるために人為的に有害生物を休眠させることが可能となることから、21世紀の生物産業の視点から考えると重要な基礎研究である。更に、休眠制御物質の機能解明は、農業分野や医薬品分野で、高品質のかつ新規な製品を開発するためにも重要な意義を持っている。

例えば、鱗翅目昆虫の一種である天蚕は多くの昆虫と同様に、秋口に休眠に入り、休眠越冬後4～5月に休眠から醒める。天蚕は、カイコ同様外見上卵内で胚休眠するが、卵内ではほぼ完全に幼虫体が形成されており、この状態で休眠に入ることから前幼虫態休眠（前幼虫休眠ともいう）の一種であると考えられている。

このタイプとしては、天蚕以外にマイマイガなど鱗翅目昆虫を中心として40種以上知られており、新しい休眠タイプとして分類されるべきである。天蚕の前幼虫休眠には、昆虫の中樞のホルモン系が直接関与するわけではなく、その前幼虫休眠は前幼虫の中胸部位に存在する制御因子 (Repressive Factor:RF) によって制御され、また、後休眠は第2腹節～第5腹節に存在する成熟因子 (Maturation Factor:MF) によって制御されるというモデルが提案されている (Suzuki et al., J. Insect Physiol., 36, 855-860, 1990、この文献は本明細書中で援用される)。成熟因子に関しては、部分精製され、ペプチド様ホルモンであると報告されている (Naya et al., Int. Wild Silkworm & silk I, 195-200, 1994、この文献は本明細書中で援用される) が、制御因子 (休眠制御物質) については未だ単離されていない。

また、胚休眠するカイコでは、休眠ホルモンが誘導ホルモンとして知られており、このホルモンは、24個のアミノ酸から構成されているペプチドホルモンで、C末端がアミド化されている (Imai et al., Proc. Japan Acad., 67B, 98-101, 1991、この文献は本明細書中で援用される)。しかし、胚休眠するタイプでは、これ以外の休眠に関連するホルモンは全く不明であり、また前幼虫休眠するタイプでは、休眠関連ホルモン物質は全く発見されていない。

昆虫以外で、冬眠特異的タンパク質と呼ばれる3種類の物質がシマリスから単離されている (Kondo et al., J. Biol. Chem., 267, 473-478, 1992、この文献は本明細書中で援用される) が、これらのタンパク質は、分子量が27K、25K、20Kと高く、しかも冬眠の前後でその血中濃度が減少し、冬眠中は低濃度である。また、哺乳類では、休眠に関する制御物質はこれまで発見されておらず、例えばワラビー (カンガルーの一種) の胚子休眠の場合は、母親の松果体が休眠に関与すると考えられているが、休眠制御物質は未だ単離されていない。

上記したように、昆虫からは、休眠制御活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、有用な休眠制御活性を有する休眠制御物質は、未だ単離されていないこと、またシマリスから単離された冬眠特異的タンパク質は、分子量が高いため抗原抗体反応が起こり易く、しかも冬眠の前後で血中濃度が減少し、冬眠中は低濃度であるという問題があること、さらにまた哺乳類では休眠制御物質がいままで見出されていないことから、休眠を制御する物質の開発が、昆虫の休眠制御のみ

ならず、休眠現象が確認されている哺乳類の休眠・発育制御までも含めたかなり広範な観点から強く望まれているのが現状である。

これまでは、昆虫の休眠といえば、卵休眠、幼虫休眠、蛹休眠、そして成虫休眠として分類されていた。しかし、生理生化学的に見ると、休眠ステージは以下述べるように複雑であり、内分泌学的に前幼虫休眠というステージも、新たなステージとして分類する必要がある。すなわち、天蚕のように単純に卵休眠に属さず、独特に前幼虫ステージで休眠するものや、ポプラハバチのように蛹休眠には分類されず、その前段階である前蛹ステージで休眠するものがある。従って、これらの昆虫種では、新しい休眠制御ホルモンやその関連物質の存在が期待される。

前幼虫休眠タイプの天蚕、マイマイガ、ウスバシロチョウ、オビカレハ、カシワマイマイなどの鱗翅目昆虫を中心とした40種以上の昆虫（これらの前幼虫休眠タイプの昆虫としては、梅谷与七郎、蚕の越冬卵より見たる昆虫の卵態越冬現象、蚕糸試験場報告、12:393-481(1946)およびUmeya Y., Studies on embryonic hibernation and diapause in insects, Proc. Jpn. Acad., 26, 1-9(1950)に記載されており、これらの文献は本明細書中で援用される）に作用する休眠制御物質についても、未だ単離されていない。このような休眠制御物質を単離・同定することが農業、林業、医薬などの分野で強く望まれ、また同物質を経済的かつ効率的に合成するための製造技術の開発が望まれている。

天蚕（正式和名：ヤママユ、学名：Antheraea yamamai Guerin-Meneville）は、わが国を原産地とし、江戸時代から飼育の記録があり長い歴史を持つこと、最近人工飼料が開発されて幼虫の飼育が容易になったこと、一般的に農家段階で飼育されていることから、飼育に関する情報が多く、しかも入手が容易であると共に、年1回発生し、卵で越冬する。家蚕（カイコ）幼虫が専ら桑の葉を食べるのに対して、天蚕はクスギ、コナラ、カシワ、アベマキなどの葉を食べる。養蚕農家が家蚕幼虫を飼育するのに対して、野生の天蚕幼虫は、自然状態で発生・生育する。天蚕種の孵化率は低く、繭糸から絹糸となる割合（糸歩）は極めて少なく、また、繭糸をとる作業が困難であるため、希少価値としての意義がある。天蚕絹糸1kgの価格が20万とも30万円ともいわれ、絹のダイヤモンドと呼ばれるほど希少価値があるのはこのためである。野蚕である柞蚕絹糸の配合率が増加した絹織

物では糸の滑りが抑えられ、縫目の滑脱抵抗が改善できるため好んで用いられる。そのため、将来、大型絹糸昆虫である天蚕を利用した分野の発展が大いに期待される。従って、天蚕の生活環境制御に関連した制御因子の単離や構造決定の重要性はますます高まっている。

これまで、天蚕の休眠制御物質の同定が遅れていた理由は次の通りである。休眠制御物質の存在は1990年に予測されていた（Suzuki et al., J. Insect Physiol. 36, 855-860, 1990、この文献は本明細書中で援用される）が、抽出法の改良と精製のためのカラムの選択に多くの時間を費やし、予期するような活性画分を単離、精製することができなかった。その主要な理由としては、同定する物質が極めて低分子の短いペプチド（以下、「低分子ペプチド」と称することもある。）であり、抽出と適切なカラムの選択に予想外の困難性があったためである。従って、前幼虫より休眠制御物質を得る際に、収率、効率、経済面で優れた精製方法の確立と容易な製造方法が望まれているのが現状である。

次に、細胞増殖制御機能を有する昆虫由来の物質について述べる。昆虫由来の生理活性物質には、いわゆる生体防御物質として知られている抗菌性ペプチドがあり、これは150種類以上にもおよび、それらの多くが単離され、構造決定されている。しかし、昆虫由来で抗腫瘍活性を持つ新規物質発見の歴史は短く、新規物質に関する知見は少ない。

昆虫由来の抗ガン性物質には、例えば、セクロピンと呼ばれるペプチドがある。最近、セクロピア蚕から単離され、構造決定されたものであり、その構造決定後、類似の構造を持った物質が多くの昆虫から単離され、同定されている。セクロピンは、リンパ腫や白血病の培養細胞に対して抗腫瘍作用があると報告されている（Moore, A. et al., Peptide Res. 7, 265-269, 1994、この文献は本明細書中で援用される）。セクロピンの遺伝子がヒトの膀胱ガン由来の培養細胞に遺伝子組換えされ、その細胞をヌードマウスに注射した結果、腫瘍細胞の成長が制御（抗ガン性）されることが実証されている（Winder, D. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 242, 608-612, 1998、この文献は本明細書中で援用される）。

また、モンシロチョウの蛹から単離された高分子量タンパク質は、ヒトの胃ガン細胞（TMK-1）のようなガン細胞に対して強い細胞毒性を有し、ガン細胞の増殖

を制御し、最終的にはアポトーシスを誘発する特異的な生理活性を示すことが報告されており、このタンパク質はピエリシン(pierisin)と命名されている (Koyama et al, Jpn. J. Cancer Res., 87, 1259-1262, 1996; Kono et al., 1997; Watanabe et al., 1998、これらの文献は本明細書中で援用される)。この細胞毒性とは、最終的にアポトーシス(細胞死)を誘導し、その結果、抗ガン性があるということを示すものである。

上記したようなセクロピア蚕からの単離タンパク質(セクロピン)およびモンシロチョウの蛹からの単離タンパク質(ピエリシン)はそれぞれ、約4 <sup>ト</sup>kDaおよび98 <sup>に</sup>kDaという高分子量生理活性物質である。これら既知の生理活性物質は、ガンの生細胞において細胞死を誘導することによりガン細胞を効率的に減少させるが、ガン細胞周期のステージを確実に変化させ、ガン細胞を一旦休止状態にさせることは不可能であるという問題がある。また、セクロピンが、ヒトのガン細胞の増殖を制御させ得ることが報告されているとしても、実用的な視点からすると、生体に適用した場合、高分子量のタンパク質は生体内で抗原抗体反応を起こすので、セクロピンなどを生体に対して使用することは望ましくないという問題がある。そこで、ガン細胞の増殖阻害物質として、昆虫由来の生理活性物質であり、ガン細胞の増殖制御機能のような生体細胞の細胞制御機能を持ち、しかも生体に投与した際に、抗原抗体反応を起こさない生理活性物質の出現が強く望まれている。

#### 発明の開示

本発明の目的は、昆虫由来の遺伝子Any-RF、休眠制御物質およびその製造方法、ならびに生体細胞の細胞制御機能(例えば、ガン細胞の増殖制御機能)を持ち、生体内で抗原抗体反応を起こさない生理活性物質を有効成分とする生体細胞の細胞制御剤(例えば、ガン細胞の増殖制御剤)を提供することにある。そのために、昆虫の前幼虫体より、休眠制御活性、生体細胞の細胞制御機能を有する遺伝子Any-RF、休眠制御物質、生体細胞制御剤を効率的にかつ経済的に単離、同定、精製する。



本発明の遺伝子Any-RFは、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列、Asp-Ile-Leu-Arg-Glyを有し、C末端がアミド化されており、分子量が570,959であるタンパク質をコードするものであり、休眠制御活性を有し、天蚕の前幼虫由来のものである。

本発明の休眠制御物質は、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列、Asp-Ile-Leu-Arg-Glyを有し、C末端がアミド化されており、分子量が570,959である。

本発明の休眠制御物質は次のようにして製造できる。例えば、天蚕前幼虫体などのような鱗翅目昆虫の前幼虫体を粉碎したものにメタノール：水：酢酸からなる酸メタノール液を加え、乳鉢内で摩砕後、遠心処理し、得られた上清を逆相高速流体クロマトグラフィおよび混合分離モード高速液体クロマトグラフィからなるHPLCシステムに導入することにより単離・精製して得られるか、または公知のペプチド合成装置を用いて公知の方法に従って得られる。

本発明の遺伝子Any-RFを有する休眠制御物質を、休眠覚醒させるように発育が運命づけられた休眠中の前幼虫などに対して投与すると、運命づけられた休眠覚醒を延長させたりまたは停止させたりすることができる。そのため、休眠することが確認されている生物に対して本発明の休眠制御物質を適用することにより、これらの生物が休眠する本質である低エネルギー代謝の生命機構を解明することが可能となる。この物質は、最終的には長寿促進物質の開発のためのリード化合物ともなり得る。

本発明の休眠制御物質は低分子ペプチドであるので、生体外から投与しても抗原抗体反応が起こり難く、しかも格別の発育制御活性を有していることから、この構造そのままで種々の休眠型生物に直接投与できる。その上、この低分子ペプチドと同じ構造を有する合成ペプチドを生体外から投与することによって、可能性のある種々の機能について簡易に試験・研究ができるという利点がある。

また、本発明の生体細胞の細胞制御剤、例えばガン細胞増殖制御剤は、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列、Asp-Ile-Leu-Arg-Glyを有し、C末端がアミド化されており、分子量が570,959であるペプチドを有効成分として含有するものである。このペプチドは、上記したように、天蚕の前幼虫由来のものである。

り、同様にして得られる。

さらにまた、本発明の生体細胞の細胞制御剤、例えばガン細胞増殖制御剤は、上記したような配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列から N 末端の Asp を欠いたアミノ酸配列、Ile-Leu-Arg-Gly を有し、C 末端がアミド化されており、分子量が 456.58 であるペプチドを有効成分として含有するものであってもよい。

本発明の生理活性物質であるペプチドは、5 個のアミノ酸からなるペンタペプチド（分子量 570.595<sup>959</sup>）、または 4 個のアミノ酸からなるペプチド（分子量 456.58）であるため、蚕由来のセクロピン（分子量約 4 K）およびモンシロチョウ由来のピエリシン（分子量 98 K）と比較して、生体に投与しても抗原抗体反応が起こり難く、しかも格別顕著な抗ガン活性を有している。かくして、本ペプチドのような低分子ペプチドは、ヒトだけでなく、家畜などの高等動物に対しても、そのままの形で生体外から直接投与でき、この投与によって抗ガン機能を発揮させることができるという利点を持っている。

さらにまた、本発明の生理活性物質であるペプチドは、抗原抗体反応を起こすことのない細胞増殖制御効果のある新しい医薬ともなり得る。本発明の遺伝子 Any-RF を有する低分子ペプチドは、副作用を伴わずに効率的にガン細胞の増殖を阻害する機能を持つので、ヒトの子宮ガン、肝臓ガン、肺ガン、胃ガン、乳ガンなどの細胞増殖を効率的に制御し、ひいては生体細胞の細胞制御を効率的に行うことができる。

この生理活性物質は、ガン細胞の生細胞を増加させない機能を持つとともに、生存するガン細胞に対して、ガン細胞の周期ステージを変化させ、一旦休止状態にさせる点に大きな特徴がある。この点において従来の如何なる抗ガン剤の作用機序とも異なっており、医薬品として極めて有用である。すなわち、本発明の生理活性物質は、DNA 複製期に相当する S 期を減少させ、静止期の G<sub>0</sub> ならびに第 1 期に符合する G<sub>1</sub> 期を延長させる機能を持つ。これに対し、セクロピンにしろピエリシンにしろ、生細胞を減少せしめることによりガン細胞の増殖を制御する機能を持ち、正常細胞への悪影響（アポトーシス）を引き起こすことによりガン細胞の増殖を阻害しているに過ぎない。かくして、本発明の生理活性物質は、上記セクロピンやピエリシンを含めた従来の抗ガン剤が持つ正常細胞へのアポト

ーシス問題を解消し、静止期にある多くの正常細胞へは影響もなく、増殖細胞だけを制御するという優れた働きを持ち、ガン細胞の増殖を効率的に阻害する。

一般に、細胞周期においてはG 0 期とG 1 期が最も長い時間を要するといわれている。その両ステージを増大するように作用する本発明の生理活性物質は、従来報告されている昆虫由来のガン細胞制御効果物質とは根本的に異なっている。従来のものはアポトーシスに伴う核の凝縮や断片化を誘導し、その結果、生細胞数を減少せしめるものである。しかし、本発明の生理活性物質の機能は、細胞周期のG 0 とG 1 を増大しS 期を減少させ、その結果、生細胞の細胞周期が長時間となり、最終的には増殖を制御することにある。従って、本発明の生理活性物質は、ガン細胞増殖において細胞死を誘導するのではなく、細胞周期を制御し細胞の増殖を制御することで細胞数が増えないように作用している。

本発明の生理活性物質は、上記したように、生理活性機能の一つとして、天蚕前幼虫の休眠を長く維持するように作用する。一般に生物の休眠とは、細胞の増殖が停止し低エネルギー状態を維持することが特徴と考えられている。従って、この物質の機能を多面的に応用する一例として、哺乳類のガン細胞増殖を制御する目的においても活用できる。さらに、多くの生物細胞の増殖を抑えると考えられるので、細胞レベル・個体レベルでの培養細胞の長期保存剤としても利用できる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の休眠制御物質の単離、精製プロセスを示すフローシートであり、

図 2 は、本発明の休眠制御物質の単離プロセスにおける第 1 回目のHPLCシステム（逆相HPLC）による活性画分の溶出ピークを示すスペクトルであり、

図 3 は、本発明の休眠制御物質の単離プロセスにおける第 2 回目のHPLCシステム（逆相HPLC）による活性画分の溶出ピークを示すスペクトルであり、

図 4 は、本発明の休眠制御物質の単離プロセスにおける第 3 回目のHPLCシステム（混合分離モード）による活性画分の溶出ピークを示すスペクトルであり、

図 5 は、本発明の休眠制御物質である単離精製物のペプチドの分子質量を測定

した質量分析スペクトルであり、

図6は本発明の休眠制御物質と同じアミノ酸配列を有し、かつ、C末端も同じ合成ペプチドの分子質量を測定した質量分析スペクトルであり、

図7は、本発明の休眠制御物質と同じアミノ酸配列を有するが、C末端が異なる合成ペプチドの分子質量を測定した質量分析スペクトルであり、

図8(A)は、前血清を注射した天蚕前幼虫で、休眠継続の状態を示す写真であり、また、図8(B)は、抗血清を注射した天蚕前幼虫で、休眠覚醒の状態を示す写真であり、

図9は、DILRG-NH<sub>2</sub>またはDILRG-COOHによるラット肝ガン細胞(dRLh84)の形態学的変化と増殖制御を示す顕微鏡写真であり、

図10は、DILRG-NH<sub>2</sub>またはDILRG-COOHによるラット肝ガン細胞(dRLh84)の増殖制御効果を、濃度と生細胞数との関係で示すグラフであり、

図11は、DILRG-NH<sub>2</sub>またはPBS(-)によるラット肝ガン細胞(dRLh84)の増殖制御効果を、培養時間と生細胞数との関係で示すグラフであり、

図12(A)は、PBS(-)を添加した場合のラット肝ガン細胞(dRLh84)の細胞周期変化を示すスペクトル(対照区)であり、また、図12(B)は、RF-NH<sub>2</sub>を添加した場合のラット肝ガン細胞(dRLh84)の細胞周期変化を示すスペクトル(実験区)であり、そして

図13は、DILRG-NH<sub>2</sub>によるラット肝がん細胞(dRLh84)の増殖制御効果を、他の物質による増殖制御効果と比較して示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明で利用できる昆虫には、前幼虫体で休眠するタイプの昆虫であれば、天蚕のみならず、上記したような、世界的な森林の大害虫であるマイマイガ、ウスバシロチョウ、オヒカレハ、カシワマイマイの他40種以上の鱗翅目昆虫の幼虫、およびキリギリス類などの直翅目昆虫の幼虫などが含まれる。本発明では、遺伝子Any-RFを単離するための対象昆虫として、入手が容易であり、かつ飼育に関する情報の多い天蚕の幼虫を便宜的に使用する。以下、天蚕を中心に本発明を説明

する。最初に休眠制御物質について説明し、次いで生体細胞の細胞制御剤について説明する。

本発明の休眠制御物質は、上記したように、休眠制御機能を持つ新規ペプチドであり、N末端より5サイクルまでのアミノ酸配列がAsp-Ile-Leu-Arg-Glyであって、C末端が遊離酸化された化合物ではなく、アミド化された低分子物質（分子量：570.959）である。このことは、後述する実施例に示された合成物の生物検定試験からも、C末端がアミド化されたものにだけ活性機能があることから明らかである。この物質は、例えば天蚕の前幼虫から単離、精製することもできるし、アミノ酸配列が解明できているので、従来の方法で合成することもできる。

天蚕のような鱗翅目昆虫から得られた前記休眠制御物質と同様のアミノ酸配列を持つ組成物は、上記の多様な鱗翅目昆虫および直翅目昆虫の休眠を効率的に制御する。このことは、生物の概日リズム（生物時計）の点からも自明である。すなわち、Beck, S.T., Insect photoperiodism, pp. 288, Academic Press, London (1968) および近藤孝男、植物の生物時計、化学と生物、28:810-819 (1990)（これらの文献は本明細書中で援用される）には、概日リズムを利用して、動物の生殖活動（カンガルーの休眠も含まれる）、昆虫の休眠、植物の花芽形成（休眠も含まれる）など多くの生物の発生現象をコントロールすることが示されているからである。

上記したように、天蚕の前幼虫休眠の維持に関与する制御因子であるペプチドのアミノ酸配列構造は、Asp-Ile-Leu-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>である。このペントペプチドは、コンピューターサーチ（BLASTおよびFASTA）によっても既知のものがなく、生物界において新規の休眠制御活性ペプチドである。これを *Antheraea yamamai*-Repressive Factor (略称Any-RF) と命名した。5個のアミノ酸のC末端がアミド化されている本ペプチドは、本発明が完成されるまで、生物界では、フリーの存在様式としては見出されていなかった。しかし、いくつかの生物タンパク質のアミノ酸配列の中には、同じ ---Asp-Ile-Leu-Arg-Gly--- の配列がみられる。例えば、コンピューターサーチによれば、イーストの仮説22.1KDタンパク質（193個のアミノ酸）の166～170番までの配列、ヒトの白血病阻止因子前駆体（2

0 2 個のアミノ酸) の 1 4 2 ~ 1 4 6 番までの配列が同じである。しかし、この部分のアミノ酸配列の機能についてはまったく明らかにされていない。すなわち、アミノ酸配列が同じでも、本ペプチドのように、N末端とC末端の間に介在し、C末端がアミド化してフリーの存在様式で生理機能を有するものは、まったく見出されていない。

従って、本発明により、昆虫内分泌学上従来全く知られていない物質で昆虫の休眠性を制御する新規ペプチドホルモンが分離、同定でき、昆虫休眠メカニズムの機構が初めて明らかとなった。休眠する生物は、昆虫だけではなく海産生物、植物、そして哺乳動物のワラビー（カンガルーの仲間）まで確認されているので、本発明の休眠制御物質を用いることにより、それらの生物が休眠する本質である低エネルギー代謝の生命機構を解明するための重要な手がかりが得られる。将来的には長期にわたり生命維持を促進させる物質となり、最終的には長寿促進物質開発のためのリード化合物となり得る。

また、本発明において、天蚕から見出された新規ペプチドは、5 個のアミノ酸から構成されるペンタペプチドであるので、生体外から投与しても抗原抗体反応が起こりにくい。しかも、このペプチドは、休眠打破（休眠覚醒）用の人工合成物により休眠覚醒化が完全に運命づけられた天蚕の休眠覚醒を遅らせ、しかも休眠覚醒率を減少させるほどの発育制御活性を有している。このことから、この構造そのままでも、生物の概日リズムの点からみて、違った昆虫種のみならず、海産動物、植物、哺乳類にも直接投与できることは前記文献からも自明である。

上記したように昆虫の休眠覚醒化を運命づけるには、通常、(1) 休眠中のいかなる時期の卵でも適用できる方法として、ピンセットを使用しながら除殻し、休眠前幼虫を取り出し、この前幼虫の腹面に、アセトンに溶解したイミダゾール化合物（1-ベンジル-5-[(E)-2,6-ジメチル-1,5-ヘプタジエニル]イミダゾール（以下、KK-42と称す））を  $0.1 \mu\text{g} / 0.5 \mu\text{l}$  塗布する方法と、(2) ステージが限定された方法として、産卵後約 1 ヶ月間  $25^{\circ}\text{C}$  に保存し、その後 2 ~ 3 ヶ月間  $2 \sim 5^{\circ}\text{C}$  で低温処理する方法との 2 種類がある。休眠制御機能を明らかにするには、上記 2 種類の方法のいずれかで休眠覚醒化を運命づけた前幼虫の 2 4 時間後のものに対して、休眠制御物質を接種すればよい。例えば、ガ

ラスキャピラリー管を利用し、蒸留水に溶解した各種濃度の本発明の休眠制御物質水溶液  $0.05 \mu\text{l}$  を該前幼虫に対して、その頸部などから経皮的に、あるいは経口的に接種する。

本発明の休眠制御物質は、昆虫では、カイコに限らず、かなり広範な昆虫種において、しかもその昆虫種の各ステージにおいて、多様な発育制御物質として作用するものであるといい得る。従って、本発明の新規ペプチドは、前幼虫昆虫の休眠制御物質であるばかりでなく、他の昆虫および哺乳類などまでを含めた広範な動物に対する発育制御剤としても優れた生理機能を有するといえる。

上記したように、本発明のペンタペプチドは、前幼虫というステージに限らず、他のステージにおいてもその機能を発現するものと期待される。すなわち、昆虫は一般に前幼虫（卵内で幼虫体が形成されている）の次の段階は、孵化して幼虫ステージとなる。この幼虫ステージで休眠するヨトウガをはじめとする多くの昆虫でも、同じ物質が同様に見出される可能性がある。なぜなら、昆虫のホルモン類は、違う昆虫でしかもステージが異なれば、同じ物質でも違う機能を発現することがよく知られているからである。例えば、幼若ホルモンの場合、鱗翅目昆虫の幼虫（例えば、ヨトウガ幼虫）では、休眠維持や幼虫形質の維持として作用するが、鞘翅目昆虫の成虫（例えば、コガタリハムシ成虫）では、生殖腺刺激作用を示し、欠如すれば休眠維持となることから類推できる。従って、今回天蚕から単離された新規ペプチドは、カイコに限らず、かなり広範な昆虫種で、しかも各ステージで多様な発育制御物質として作用する可能性がある。

昆虫休眠に関する従来既知の物質としては、前記したように、カイコの休眠ホルモンがわずかに報告されているに過ぎない。これはペプチドアミドで、昆虫の多くのペプチドホルモンがこのグループに分類され、C末端が共通して、Phe-X-Pro-Arg-Leu-アミドとなっている。すなわちEXPRLアミドファミリーの一種である。しかし、この休眠ホルモンは、カイコで休眠誘導に関与するホルモンであり、休眠維持の機能はない。

カイコの場合は、母親の蛹期の食道下神経節から分泌される休眠ホルモンが卵巣に作用し、その後に産卵した卵内の胚子の休眠を決定づける。すなわち、休眠ホルモンの作用の時期と休眠が実行される時期に時間的な開きが存在している。

ところが、天蚕の場合には、新規ペプチドの作用と休眠の実行が同じ時期にあるということが特徴である。しかし、本発明の新規ペプチドは構造と機能とも既知の休眠ホルモンとはまったく異なるものである。

また、本発明のペプチドは5個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの一種であることから、昆虫以外の生物種においては、休眠制御物質または発育制御物質としての可能性だけではなく、例えば哺乳類などの睡眠調節物質の作用も期待される。特に、高等動物においては、上記したように、本ペプチドのように短い低分子のペプチドは抗原とはなり難いので、合成ペプチドによる生体外からの投与によって、可能性のある機能について簡易に試験研究できるという特徴を持っている。さらに本発明の新規ペプチドは、抗原抗体反応がなく、細胞増殖制御効果のある新しい医薬となり得る。

脱皮・変態を制御するエクダイソンや幼若ホルモンなどの昆虫で最初に発見された生理活性物質は、今日では昆虫はもとより、甲殻類（カニやエビ類）、環形動物（ゴカイやミミズ類）、あるいはトガリバマキやヒナタイノコズチなどの植物からも発見されるようになった（川島誠一郎編、内分泌学、pp. 159、1995、この文献は本明細書中で援用される）。また、これまでカイコの休眠を誘導するホルモンとして知られていた休眠ホルモンも、例えばオオタバコガ、アワヨトウなどの他の昆虫で発見されているFXPR<sub>L</sub>アミドファミリーに属するものとされている。このような事実から判断すると、本発明のペントペプチドは、天蚕以外の他の昆虫からも同様に単離・同定できる技術的蓋然性が非常に高い。

さらに、天蚕は、前幼虫ステージだけではなく蛹のステージでも、夏眠と呼ばれている生理現象があり、約1ヶ月の短期間ではあるが8月頃休眠する。昆虫の蛹休眠は、脱皮ホルモン（エクダイソン）の欠如で休眠するとされている。従って、今回発見されたペントペプチドが天蚕の蛹休眠だけではなく、モンシロチョウ、サクサン（柞蚕）、アメリカシロヒトリ、タバコガ類などの他の昆虫の蛹休眠をも制御する技術的蓋然性が非常に高い。すなわち、ペントペプチドは、低エネルギー代謝という特定の生理状態を保つ機能（天蚕前幼虫の休眠維持の機能を指す）を有していることから、ステージが蛹で、同じ生理状態を長期間維持する他の昆虫の蛹休眠においても、同じように作用すると考えられる。従って、蛹休



眠するモンシロチョウ、サクサン、アメリカシロヒトリ、タバコガ類などからも、同様なペンタペプチドが発見され得る。一方、蛹休眠だけではなく、他の昆虫の幼虫期で発見される可能性もある。すなわち、すでに述べたように、昆虫ホルモンでは、昆虫種が異なり、ステージが異なれば、同じ構造物質でも異なる機能を有することがある。そこで、同じペンタペプチドならびにその関連物質は、多くの昆虫種から、休眠制御因子または発育制御因子として同定できるであろう。

本発明においては、天蚕の前幼虫体内から新規ペプチドを単離、同定するために、産卵後1ヶ月以内の休眠中の卵から前幼虫を摘出し、直ちに液体窒素で凍結し、その後は単離プロセスで使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存する。単離プロセスでは、図1に示した方法に従って、前幼虫に10倍容の酸メタノール液（例えば、メタノール：水：酢酸 $=90:9:1$ ）を加え、乳鉢内で磨砕後、10,000gで30分間遠心処理してその上清を調製する。この操作を3回繰り返し、合わせた上清を遠心バポライザーで濃縮し、次いで得られた上清をHPLCシステムに導入すればよい。

酸メタノール液に酢酸を用いる理由は、次の通りである。この抽出法は他の昆虫のペプチドホルモンを抽出する際にも使用されており、酢酸を添加することによって、90%以上のプロテアーゼ活性を制御し、ペプチドの分解を抑えることができる。酸メタノール液としては、メタノール：水：酢酸 $=90:9:1$ （容量%）が最適であるが、この範囲に特に限定されるわけではない。

なお、該ペンタペプチドは、上記したような多くの昆虫種の個体全体から、図1に示した方法に従って、天蚕前幼虫と同じ方法で抽出できる。直接体液から抽出する場合には、幼虫体の脚などの生体組織の一部を切開することで体液を流出せしめ、図1のメタノール：水：酢酸 $=90:9:1$ の水の部分に置き換えることで調製した90%酸メタノール液を氷冷中で混合し、その後、図1に従って抽出するとよい。

前幼虫の取り出し方としては、上記したように産卵後1ヶ月以内の休眠卵を用いるとベストであるが、その理由は次の通りである。産卵後約10日から休眠開始して20日以内は、休眠の深度が強いと考えられるが、一般に昆虫の休眠は、さらに時間が経過すれば浅くなるためである。本発明において、天蚕の前幼虫1,

500頭より最終的に得られるホルモン様物質である休眠制御物質は、かなり少量である。表1記載の活性と約571という分子量から推定すると、天蚕の前幼虫1、500頭より本発明の昆虫の休眠制御物質が僅か21.4 $\mu$ g単離され得ると算出されるに過ぎない。ところが、天蚕は、カイコと比較して完全な人工飼料も開発されておらず、産卵技術も困難であることから、1卵当たり5~20円という高価格になる。従って、天蚕を用いて本発明の新規生理活性物質を調製するには効率的、経済的に引き合わない。

一般に、ホルモン様物質の抽出で重要な要因となるのは、高い回収率を得るために原材料として何を選ぶかという点および効率よく分離するためにカラム樹脂として何を選ぶかという点であるが、合成できればそれに越したことはない。しかるに、上記したように休眠制御物質のアミノ酸配列が判明したので、この配列を持つ活性物質を従来の方法で経済的に、効率的に合成できる。

新規ペプチドの遺伝子が同定できれば、昆虫のみならず、多くの生物種を含んだ生物産業分野で幅広い応用が可能となり、自在に生物の発育制御が実現できる。そこで、このペプチドのアンチセンス遺伝子組み換え体、すなわち、ペプチド遺伝子と対になる遺伝子を導入し、本来の遺伝子発現を制御する方法で、休眠しないマイマイガを創出し、これを放飼すれば、地球上のマイマイガの個体数は減少し北米の森林産業に多大な経済的貢献が期待される。また、該ペプチドを各種の培養細胞の培地添加剤として用いることで、培養細胞の長期保存が可能となるので、培養細胞の長期保存剤の開発にも繋がり、最終的には、昆虫培養細胞のための長期保存剤の開発を進める上での技術の核となり得る。

次に、本発明の生体細胞制御剤に付いて説明する。

上記したように、前幼虫休眠タイプの天蚕、マイマイガ、ウスバシロチョウ、オビカレハ、カシワマイマイなどの鱗翅目昆虫および直翅目昆虫を中心とした40種以上の広範な昆虫に特異的かつ効率的に作用する休眠制御活性を有する生理活性物質に関する発明について明らかにした。さらに、本発明者らは、この生理活性物質が生体細胞の効率的な制御活性、例えば、ガン細胞の効率的な増殖制御活性を有するものであることも見出した。すなわち、上記した遺伝子Any-RFは、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列、Asp-Ile-Leu-Arg-Glyを有し、C末端が

アミド化されており、分子量が570,959であるタンパク質をコードするものであり、この生理活性物質がガン細胞の増殖を効率的に制御すること、ひいては生体細胞を効率的に制御する活性を有することを見出したものである。

本発明の生体細胞の細胞制御剤、例えばガン細胞の増殖制御剤は、上記したペントペプチドを有効成分として含有するものである。本発明の有効成分である生理活性物質は、上記したように、N末端より5番目までのアミノ酸配列がAsp-Ile-Leu-Arg-Glyであって、C末端がアミド化されているものである。この有効成分は、上記したように単離・精製して得ることもできるし、または公知のペプチド合成装置を用いて公知の方法に従って調製することもできる。

本発明の生理活性物質は、例えばガンの生細胞を効率的に減少させることができ、ガン細胞周期のステージを確実に変化させ、ガン細胞を一旦休止状態にさせる方向へと移行させることが可能になる。このような機能を持つ生理活性物質は有効なガン細胞増殖制御剤として用いられ、ひいては抗ガン剤として実用化できる可能性がある。従来の抗ガン剤が持つ正常細胞への悪影響（アポトーシス）問題を解消し、静止期にある多くの正常細胞へは影響がなく、増殖細胞だけを制御するという優れた働きを持つ。また、この生理活性物質は、生体細胞の細胞制御因子(cell regulator)として細胞増殖を可逆的に制御できるものであり、例えばガン細胞の増殖を効率的に制御でき、しかもアミノ酸5個から成る低分子量のペントペプチドであり、生物界では新規物質である。さらにまた、この生理活性物質は、既知のセクロピンまたはピエリシンとは構造上の類似性は全く無く、しかも、例えばラットの肝ガン細胞などの増殖を効率的に制御すると同時に、ガン細胞を制御するメカニズムについても従来技術には無い特徴ある制御機構を示す。すなわち、細胞周期を改変する特徴を有し、細胞増殖を可逆的に制御することが可能である。また、細胞周期のメカニズムを解明する上でも有用な生理活性物質である。

ガン細胞の増殖の場合、その周期ステージは、以下述べるような通常の細胞増殖と同様に、基本的な細胞周期に依存するものであるが、細胞増殖は、そのチェックポイント制御系に異常が発生することで進行しつづける。ここで、チェックポイント制御系とは、細胞周期にミスが発生し、破滅的な遺伝的損傷が細胞に起

こるのを防ぐシステムを意味するものであり、こうした機能を利用すれば細胞周期を制御できる。このような細胞増殖とは逆に、成長分化し終えた細胞の場合、G 0 期（静止期）で細胞分裂は起こらない。一般的に、成長過程の細胞は次のような細胞周期ステージを展開する。すなわち、G 0 期（静止期）からG 1 期（DNA複製決定期）へと進み、次いで、S期（DNA複製期）を経て、G 2 期（有糸分裂準備期）からM期（細胞分裂期）へと進行する（本明細書中では、G 2 / M期と略記）。その後、再びG 0 期へと進むか、またはG 0 期を経ないで直接G 1 期（DNA複製決定期）（本明細書中では、G 0 / G 1 期と略記）へと進むこともある。

本発明の生理活性物質は、ガン細胞数を増加させない機能を有するとともに、生存するガン細胞の周期ステージを大きく変化させる点に大きな特徴があり、DNA複製期に相当するS期を減少させ、静止期のG 0 およびDNA複製決定期に対応するG 1 期を延長させる機能を持つ。かくして、本発明の生理活性物質がガン細胞の増殖を効率的に阻害することになる。本発明における天蚕由来の生理活性物質がガン細胞の増殖を効果的に阻害することは、上記のように特定のガン細胞周期ステージに特異的に効果を現すことから明らかである。

本発明の生理活性物質は、上記したように、生理活性機能の一つとして、天蚕前幼虫の休眠を長く維持するように作用する。一般に生物の休眠とは、細胞の増殖が停止し低エネルギー状態を維持することが特徴と考えられている。従って、この物質の機能を多面的に応用する一例として、哺乳類のガン細胞増殖を制御する目的においても活用できる。さらに、多くの生物細胞の増殖を抑えることが予想され、細胞レベル・個体レベルの長期保存剤の開発にも利用できる。

一般に、タンパク質は、実際に生体に適用される場合、その分子量が大きいと、生体内で抗原抗体反応を起こすので、大きな障害となる。上記したように、蚕由来のセクロピンは分子量が約4 Kであり、また、モンシロチョウ由来のピエリシンは9.8 Kであるので、生体に投与すると抗原抗体反応が起こり易い。これに対し、本発明における天蚕由来の生理活性物質は、5.71、9.59と低分子量のペプチドであるので、昆虫以外の生物種においては生体に投与しても抗原抗体反応が起こり難いという特徴を有し、昆虫などから分離・精製されたペプチド

でも合成されたペプチドでも有効な効果を発揮できる。従って、抗ガン活性という特異的な機能を有しているこのペプチドは、そのままでも種々の動物に直接投与できる。高等動物においても、本ペプチドのような低分子ペプチドは抗原とはなり難いので、該ペプチドの生体外からの投与によって、抗ガン機能を発揮させることができるという特徴を持っている。脊椎動物の免疫グロブリンによる抗原抗体反応では、生体外から侵入するのが低分子のオリゴペプチドであれば抗原とはならないからである。さらに、合成ペプチドによる生体外からの投与によって、可能性のある機能について簡易に試験・研究できるという特徴もある。

さらに、本発明のペプチドは、上記したように抗原抗体反応を起こすことがなく、しかも細胞増殖制御効果をもっているので、新しい医薬、または抗ガン剤開発のリード化合物としても有望である。しかも、ガン細胞の生細胞を増加させることのない機能を保つとともに、生存するガン細胞に対して、ガン細胞の周期ステージを変化させ、細胞増殖を一旦休止状態にさせるという大きな特徴を持っている。この点は、従来の如何なる抗ガン剤の作用機序とも異なっている。すなわち、一般に、細胞周期においてはG 0 期とG 1 期が最も長い時間を要するといわれている。本発明の生理活性物質は、DNA複製期に相当するS 期間を減少させ、静止期のG 0 ならびに第1 期に符合するG 1 期を延長させる機能を持つ。かくして、その両ステージを増大するように作用する本発明の生理活性物質は、従来報告されている昆虫由来のガン細胞制御効果物質とは根本的に異なっており、ガン細胞の増殖を効率的に阻害する。これに対し、セクロピンにしるピエリシンにしる、従来のものはアポトーシスに伴う核の凝縮や断片化を誘導し、その結果、生細胞数を減少せしめるものである。しかし、本発明の生理活性物質の機能は、細胞周期のG 0 とG 1 を増大しS 期を減少させ、その結果、生細胞の細胞周期が長時間となり、最終的には増殖制御をすることにある。従って、本発明の生理活性物質は、ガン細胞の増殖において細胞死を誘導するのではなく、細胞周期を制御し細胞の増殖を制御することで細胞数が増えないように作用している。

上記生理活性物質は、天蚕の前幼虫態休眠だけではなく、天蚕で前幼虫以外のステージで、または天蚕以外の昆虫で、例えば、同じステージで休眠する昆虫種や他のステージで、また、サクサンやクスサンのような他の野蚕でも、当該生理

活性物質を単離できる可能性はある。昆虫ホルモンでは、昆虫種が異なり、ステージが異なれば、同じ構造物質でも異なる機能を有することがあるからである。すなわち、昆虫の休眠は、天蚕の場合のように前幼虫態休眠するだけではなく、カイコのように胚子休眠する種、ヨトウのように幼虫休眠する種、サクサンやモンシロチョウのように蛹休眠する種、そしてナミテントウやハムシ類のように成虫休眠する種などに分類されている。あらゆる休眠形態からでも本発明における生理活性物質は単離できると当然に予想され得る。従って、同じペンタペプチドならびにその関連物質は、多くの昆虫種から、ガン細胞増殖制御因子のような細胞制御因子として同定できる。該ペンタペプチドは、このような多くの昆虫種の個体全体から、上記したように、図1に示した方法に従って抽出できる。

ガン細胞の増殖を制御する機能を持つペンタペプチドはまた、上記したように、コンピューターサーチ（BLASTおよびFASTA）によっても既知のものが無く、生物界においては新規な抗ガン機能を持つペプチドである。

天蚕由来の上記生理活性物質はまた、休眠維持の機能以外に、ガン細胞の増殖制御機能のような生体細胞制御機能を持つ物質であることが明らかとなった。この物質は、それ自体が生体細胞の細胞制御剤として有用であることに加え、将来的にはガン治療薬を含めた新規医薬品開発のためのリード化合物として重要となるものと考えられる。

以上述べたように、本発明により、昆虫内分泌学上従来全く知られていない物質で、生体細胞の細胞制御因子である生理活性物質が始めて明らかになった。

本発明の遺伝子Any-RFを有する低分子ペプチドは、副作用を伴わずに効率的にガン細胞の増殖を阻害する機能を持ち、ラットの肝ガン細胞の増殖を制御することから、ヒトの肝ガン、肝臓ガン、肺ガン、胃ガン、乳ガン、子宮ガンなどの細胞増殖を効率的に制御し、ひいては生体細胞の細胞制御を効率的に行う蓋然性が極めて高い。

本発明において細胞制御剤とするためには、通常の薬剤と同様に、例えば経口的には、錠剤、糖衣錠、硬質カプセル剤、または軟質カプセル剤等の固形剤の形や、溶液、エマルジョン、または懸濁剤等の液剤の形の種々の投与形態の製剤とすることができる。また、これらの製剤の調製に当たっては、製剤化のための周

知の各種添加剤、例えば賦形剤、安定剤、防腐剤、溶解剤、湿潤剤、乳化剤、滑沢剤、甘味剤、着色剤、香味剤、緩衝剤、酸化防止剤等を任意に配合して製剤化することができる。本発明の細胞制御剤としての有効量は、一般に50～350 mg/kgであり、好ましくは100～200 mg/kgである。その投与方法は、生体内に投与できる方法であれば手段を選ばず、例えば、経口投与でも、静脈注射でも、腹腔内投与などでもよい。

本発明の上記生理活性物質であるペプチドは、従来のセクロピンやピエリシンと比べて、生体内での副作用がほとんどなく、また、急性毒性も観測されなかった。すなわち、ラットとマウスとに対して、それぞれ体重1 kg当たり0.5 gの本発明のペプチドを経口および経皮の2通りの方法で投与し、所定の方法で毒性試験を行ったところ、いずれの動物にも痙攣や嘔吐のような急性毒性は観測されなかった。さらに、毒性試験後の各動物の生殖器官の精巢を摘出して、その組織について顕微鏡により観察したが、異常性は認められなかった。また、本発明のペプチドは、低分子量のペンタペプチドであるため、安全性からみても抗原抗体反応は起こり難い。

なお、本発明におけるアミノ酸配列Asp-Ile-Leu-Arg-Glyに対する塩基配列としては5'-GAY-ATH-YTN-MGN-GGN-3'が考えられる。

#### (実施例)

次に、本発明を実施例および比較例に基づき詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。以下の実施例では、単離ペプチドと同じ配列構造を有する合成ペプチドを用いて次の各種試験を行った。

##### (1) 活性画分の単離

本発明の休眠制御物質を、図1に示すプロセスに従って、以下のようにして単離、精製した。

産卵後1ヶ月以内の天蚕の休眠中の卵から前幼虫を摘出し、直ちに液体窒素で凍結し、その後は使用するまで-80℃で保存した。約1,500頭(約6g)の前幼虫に10倍容の酸メタノール液(メタノール:水:酢酸=90:9:1(容量%))を加え、乳鉢内で磨砕後、10,000gで30分間遠心処理してその上清を得た。この操作を3回繰り返し、合わせた上清を遠心バポライザーで濃縮

した。濃縮液を100℃で10分間熱処理し、10,000gで15分間遠心処理した。かくして得られた上清に、上清の最終濃度が80%になるように冷アセトンを追加し、10,000gで15分間遠心処理して沈殿物を得た。この沈殿物を水に溶解し、HPLCシステムに導入した。まず、ミリポア社のミリポアフィルター(SLLH R04 NL、0.5  $\mu$ m)を通したものを逆相カラムによる高速液体クロマトグラフィで2回溶出処理し、最後に混合分離モードカラムによる高速液体クロマトグラフィで溶出処理し、単離精製物を得た。

この単離方法における最初の逆相高速液体クロマトグラフィ(RP-HPLC)では、カラムとしてTSKgel ODS-80Ts(東ソー株式会社製)を使用し、2回目のRP-HPLCシステムでも同じカラムを使用した。3回目の逆相とイオン交換モードを備えた混合分離モード高速液体クロマトグラフィでは、カラムとしてRSpak NN-614(昭和電工株式会社製)を使用した。いずれのシステムでも、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)水溶液(容量%)にアセトニトリルを追加しながら、アセトニトリルの濃度(%)勾配を変化させ、その濃度勾配を利用しながら活性画分を溶出した。吸光度は220nmで測定し、流速は1ml/分または0.5ml/分とした。

## (2) 生物検定

一般に、制御因子の活性測定では、非休眠タイプを利用し、休眠誘導率をもって判定するが、天蚕においては非休眠系統は存在しない。そこで、休眠中の前幼虫にイミダゾール化合物KK-42で休眠覚醒化の処理を施し(Suzuki et al., Int. Society for wild Silkmoth, 79-84, 1989; Suzuki et al., J. Insect Physiology, 855-860, 1990、これらの文献は本明細書中で援用される)、24時間後に活性画分を注射し、休眠覚醒までの平均日数の遅延と休眠覚醒率の減少とに基づいて休眠制御機能を判定することにした。

## (3) N末端アミノ酸配列決定

N末端アミノ酸配列は、プロテインシーケンサーにより決定した。単離・精製した休眠制御物質のN末端アミノ酸配列を、ペプチドシーケンサーのG1000A(ヒュレットパッカード(Hewlett Packard)社製)によって解析した。

## (4) 質量分析

MALDI-TOF MS(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flig



ht質量分析計) (Voyager PerSeptive Biosystems社製)を用い、単離・精製した物質およびこの物質と同じアミノ酸配列を有するペプチドを既知の方法で合成した試料とを、それぞれ、0.5  $\mu$ l宛この質量分析計のサンプルプレート穴に注入し、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)水溶液とアセトニトリルとを50:50(容量%)の割合で混合したものの中に $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸( $\alpha$ -CHCA)を飽和せしめた等量のマトリックスと混合した。乾燥後、陽イオン化マトリックスとして分子質量を決定した。

#### (5) ペプチドの合成

上記のようにして単離・精製した本発明のペプチドの一次構造に完全に一致する5個のアミノ酸からできているペプチドを次のようにして合成した。すなわち、ペプチド合成装置(PSSM-8、株式会社島津製作所製)を用いて、通常の方法に従ってペプチドAsp-Ile-Leu-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (DILRG-NH<sub>2</sub>またはRF-NH<sub>2</sub>と称す)およびAsp-Ile-Leu-Arg-Gly-COOH (DILRG-COOHまたはRF-COOHと称す)を合成した。精製は逆相カラム ULTRON VX-ODS (20mm $\times$ 250mm、信和化工(株)製)をHPLCのシステム(LC-10A、(株)島津製作所)に接続して行った。溶出は、8ml/分の流速で、0.1%TFAの存在下でアセトニトリルの濃度勾配(0~5分は1~5%、5~35分は5~60%)を用いて行い、活性画分を溶出した。吸光度は220nmで測定した。精製したペプチドは、サンプルプレート上で等量のマトリックス(50%アセトニトリル/0.1%TFA  $\alpha$ -CHCAを飽和させたもの)と混合した後乾燥させ、MALDI-TOF MS (Voyager PerSeptive Biosystems社製)によって純度を確認した。

上記の方法に従って、DILRG-NH<sub>2</sub>(純度:95%以上、HPLCとTOF-MSで検定)およびDILRG-COOH(純度:95%以上、HPLCとTOF-MSで検定)の2種類を合成し、以下の実施例で用いた。

#### (6) 細胞と培地組成

ラット肝ガン細胞(dRLh84)を用い、この細胞の培養には、4mMグルタミン、50U/mlペニシリン、100 $\mu$ g/mlカナマイシンが含有された10%ウシ新生児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)を使用した。上記細胞について、37℃で5%CO<sub>2</sub>を含む湿潤環境下で細胞培養を行った。

#### (7) ガン細胞の増殖制御アッセイ

φ 100 mmのディッシュ（一般的にはシャーレ）に生育している細胞の古い培地を除いてPBS(-)（リン酸生理緩衝液からCaイオンとMgイオンを除去したもの）で1回洗浄した。10%トリプシン液1.5 mlを加え、均一となるように静かにディッシュ全体に行きわたらせた後に、1 mlを除いて37℃で5分間保温し、顕微鏡で細胞が底から剥がれているのを確認した。次いで、新しいDEME培地を9.5 ml加え、ピペッティングにより細胞を1個1個バラバラにして浮遊させた。この浮遊液を1/20希釈率でφ 100 mmのディッシュ（総量は10 ml）に植え込み、これをインキュベーターに入れ、24時間培養した。所定の濃度になるように各ディッシュにそれぞれのペプチドを添加して37℃で培養し、24時間および48時間経過後の時点で血球計算板を用いて細胞数を計測し、細胞増殖制御機能を検討した。

#### (8) 形態的観察

各ペプチドで処理した細胞を遠心分離により回収した後、これに100 μlの1/2 PBS(-)を加え懸濁せしめた。次ぎに、カルノア固定液を2滴加えて懸濁させ、カルノア固定液を1 ml加え重層した。この重層液を静かに攪拌し、室温で5分間静置した後遠心分離（4,000 rpm、5分）し、上清を除いて、少量のカルノア固定液を添加し懸濁せしめた。この懸濁液をスライドガラス上に1滴滴下し風乾した。さらに、細胞上に固定液1滴を滴下し、再び風乾した。これにギムザ染色液を重層し、30分間室温で染色したのち水洗し、風乾後封入を行った。顕微鏡下で核の変化を観察した。

#### (9) フローサイトメトリー（FACS）解析

各ペプチドで処理した細胞を70%エタノールを用いて4℃で4時間固定した。固定した細胞をPBS(-)で洗浄後、2 mg/mlのRNaseAを用いて37℃で30分間処理し、RNAを分解した。その後、ヨウ化プロピジウム（25 μg/ml）により30分以上染色し、ナイロンメッシュを用いて濾過した。フローサイトメーター（Becton Dickinson社製、FACSVANTAGE）により10,000個の細胞の蛍光強度（細胞あたりのDNA含量）を解析した。

（実施例1）活性画分の単離：

約 1, 500 頭の天蚕前幼虫から休眠制御物質を単離、精製するために、上記「(1) 活性画分の単離」の項で詳細に述べたプロセスを用いた。第 1 回目の RP-HPLC システムでは、溶出時間 11 ~ 17 分に活性画分が溶出された (図 2)。この活性画分を注入した第 2 回目の RP-HPLC システムでは、約 3 分に溶出される最初のピークに活性画分が確認された (図 3)。次いで、この活性画分を注入した第 3 回目の混合分離モード HPLC システムでは、約 9.5 分に溶出されるピークに活性が認められた (図 4)。この一連の操作により、単離精製は終了したものととして、以下のようにして、休眼前幼虫約 1, 500 頭からの最終活性画分をペプチドシーケンサー (前記 Hewlett Packard 社製の G1000A) で分析した。

#### (実施例 2) 制御物質の構造決定:

実施例 1 で得られた休眠制御物質  $100\ \mu\text{l}$  を純水に溶解後、休眠制御物質  $25\ \mu\text{l}$  を含んだ水溶液を用いて N 末端より 10 サイクルまで配列解析した。その結果、休眠制御活性を持つ活性物質のアミノ酸配列は、Asp-Ile-Leu-Arg-Gly であることが確認された。該活性物質の C 末端がアミド化 ( $-\text{NH}_2$ ) されているのか、または遊離酸化 ( $-\text{COOH}$ ) されているのかを調べるため、この単離精製物および前記合成ペプチドを MALDI-TOF MS (質量分析計) を用いて分析した。単離精製物においては  $571.858$  と  $572.846$  とに大きな 2 つのピークが認められ (図 5)、合成ペプチドの Asp-Ile-Leu-Arg-Gly- $\text{NH}_2$  では  $571.959$  に最大ピークが認められ (図 6)、そして合成 Asp-Ile-Leu-Arg-Gly- $\text{COOH}$  では  $573.045$  に最大ピークが認められた (図 7)。

かくして、生体内においては両タイプのアミノ酸配列が存在しているものと考えられるので、真の活性本体がどちらの C 末端を有するものであるかを明らかにするため、以下の実施例で、単離精製物、および両タイプの合成ペプチドによる生理活性を検討した。

#### (実施例 3) 単離精製物と合成ペプチドの生物検定:

単離精製物と、これと同じアミノ酸配列をもち、かつ、C 末端がアミド化されたタイプおよび遊離酸化されたタイプの 2 種類の合成ペプチドとを、休眠覚醒化を運命づけるためにイミダゾール化合物 KK-42 で処理した休眠中の天蚕前幼虫に注射し、幼虫の休眠覚醒の状態および休眠覚醒までの平均日数を調べると共に、休

眠覚醒率を評価した。すなわち、アセトンに溶解したKK-42を、一頭当たり0.1  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ の量で幼虫の腹側に塗布することによって、100%休眠覚醒させた。休眠覚醒処理をした後、24時間の時点で一頭当たり0.05  $\mu\text{l}$ の蒸留水を注射したものを対照区とした。単離精製物の場合は、蒸留水0.05  $\mu\text{l}$ に前幼虫からの単離精製物100 pmolsが含まれるように濃度調整したものを注射し、また、合成ペプチドのアミド化タイプと遊離酸タイプの場合は、一頭当たり100 pmols/0.05  $\mu\text{l}$ を注射した。いずれの場合も、休眠中の個体数、休眠覚醒した個体数、死亡個体数、休眠覚醒に要する平均日数を調べ、休眠覚醒率を評価した。得られた結果を表1に示す。

(表1)

単離精製物および合成ペプチドが天蚕前幼虫の休眠覚醒に及ぼす影響

注射した試料 (注射量)	N	昆 虫 の 数			休眠覚醒に 要する日数	休眠覚醒率 (%)
		休眠	休眠 覚醒	死亡		
対 照 区 (蒸留水、0.05 $\mu\text{l}$ )	10×3	0	30	0	5.79±0.67	100
精製ペプチド (単離精製物)	10×3	17	13	0	6.46±0.80 *	43.3
合成ペプチド (100 pmols/0.05 $\mu\text{l}$ )						
Asp-Ile-Leu-Arg-Gly-NH <sub>2</sub>	10×3	14	16	0	6.72±0.75 **	53.3
Asp-Ile-Leu-Arg-Gly-COOH	10×3	3	27	0	5.78±0.77	90.0

有意性 : \*  $P < 0.03$  ; \*\*  $P < 0.002$

表1から明らかなように、対照区の休眠覚醒までの平均日数は5.79日、休眠覚醒率は100%であった。単離精製物では、休眠覚醒までの平均日数は6.46日であり、対照区と比較して約一日延長し、しかも休眠覚醒率は43.3%

まで減少した。合成ペプチドでは、遊離酸タイプが休眠覚醒までの平均日数、休眠覚醒率とも対照区のデータに近似しており、アミド化タイプが休眠覚醒までの平均日数、休眠覚醒率とも単離精製物のデータに極めて近似していた。以上の結果は、単離し同定したペプチドのC末端がアミド化されており、このことが休眠維持の生理機能として重要であることを明らかにするものである。

従って、天蚕由来の制御因子のアミノ酸配列構造は、Asp-Ile-Leu-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>であり、その分子質量は、質量分析スペクトルのピーク測定値からプロトンの質量1を減ずればよく、570.959(Da)であることがわかる。

(実施例4) 合成ペプチドの生理活性：

構造決定した本発明のペプチド（C末端がアミド化されているペプチド）と同じ構造のペプチドを前記と同様にして合成し、その合成ペプチドの活性と濃度の関係を解析した。すなわち、イミダゾール化合物KK-42（0.1  $\mu$ g / 0.5  $\mu$ l）を休眠中の天蚕前幼虫に塗布して休眠覚醒処理し、この休眠覚醒処理した前幼虫に合成ペプチドを注射することによって、休眠覚醒をどれ程阻止できるかを調べるため、休眠個体数、休眠覚醒数、死亡個体数を調べ、休眠覚醒率を評価した。

まず、休眠覚醒作用を持つイミダゾール化合物KK-42をアセトンに溶解し、この溶液を休眠中の天蚕前幼虫の腹側に一頭当たり0.1  $\mu$ g / 0.5  $\mu$ l塗布した。KK-42で処理した後24時間の時点で0.05  $\mu$ lの蒸留水を注射し、その後24時間の時点で2回目の蒸留水を注射し、更に、2回目の注射後24時間の時点で3回目の蒸留水を注射し（以下の表2中では、それぞれ対照-1、2、3として表す）、それぞれの時点で休眠覚醒率を評価した。また、天蚕を休眠維持させるための活性を持つ合成ペプチドを、一頭当たり100 pmol / 0.05  $\mu$ l注射し（対照と同様に1回、2回、3回注射し、それぞれを×1、×2、×3として表す）、それぞれの区について休眠覚醒率を評価した。得られた結果を表2に示す。

（表2）

---

合成ペプチドの量が天蚕前幼虫の休眠覚醒に及ぼす影響

注射した試料 (注射量 × 回数)	N	昆虫の数			休眠覚醒率 (%)
		休眠	休眠 覚醒	死亡	
対照区 - 1 (蒸留水、0.05 $\mu$ l × 1)* <sup>1</sup>	10×3	0	30	0	100
対照区 - 2 (蒸留水、0.05 $\mu$ l × 2)* <sup>2</sup>	10×3	1	29	0	96.7
対照区 - 3 (蒸留水、0.05 $\mu$ l × 3)* <sup>3</sup>	10×3	3	27	0	90
合成ペプチド					
Asp-Ile-Leu-Arg-Gly-NH <sub>2</sub> (100 pmol/0.05 $\mu$ l × 1)	10×3	14	16	0	53.3
Asp-Ile-Leu-Arg-Gly-NH <sub>2</sub> (100 pmol/0.05 $\mu$ l × 2)	10×3	21	9	0	30
Asp-Ile-Leu-Arg-Gly-NH <sub>2</sub> (100 pmol/0.05 $\mu$ l × 3)	10×3	26	4	0	13.3

\* 1 : KK-42 で処理してから 2 4 時間後に 1 回目の注射を行った。

\* 2 : 1 回目の注射から 2 4 時間後に 2 回目の注射を行った。

\* 3 : 2 回目の注射から 2 4 時間後に 3 回目の注射を行った。

表 2 から明らかなように、前幼虫の休眠中幼虫、休眠覚醒幼虫、死亡幼虫の個体数ならびに休眠覚醒率でみると対照 - 1、2、3 は類似した傾向を示す。すなわち、蒸留水の注射回数が増えてもほぼすべての前幼虫は休眠覚醒状態にある。これは、KK-42 処理により天蚕前幼虫の休眠を覚醒するように運命づけされている場合、蒸留水を注射しても KK-42 の活性を妨げることはないことを意味する。一方、合成ペプチドの場合は、1 回注射した場合に比べて 2 回注射した場合には休眠覚醒率を 53.3 % から 30 % まで減少でき、3 回注射した場合にはさらに 13.3 % まで減少させることができる。以上のことは、構造決定した新規ペプチドが休眠を維持する因子であることを具体的に証明するものである。

(実施例 5) 抗血清注射による休眠制御因子の証明 :

本発明のペプチドに  $\epsilon$ -Acp (アミノカプロン酸) とシスチンを結合した Cys- $\epsilon$ -Acp-Asp-Ile-Leu-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (CXDILRG-NH<sub>2</sub>) を合成し、キャリアタンパク質として KLH を使用して、ペプチド~KLH コンジュゲートを作製し、これを免疫源としてフロインド完全アジュバンドと共に国産ウサギに注射して免疫した。ELISA で抗体産生を確認しながら、2 ヶ月の免疫期間後全採血した。このようにして抗体が産生された血清を抗血清として実験に使用した。なお、注射前に採血したものは抗体が産生されておらず、前血清として対照区に使用した。

休眠中の天蚕前幼虫に前血清と抗血清とをそれぞれ、一頭当たり 0.1  $\mu$ l または 0.2  $\mu$ l 注射した。その後、休眠中の個体数、休眠覚醒した個体数、死亡個体数を調べ、休眠覚醒率を評価した。得られた結果を表 3 に示す。

(表 3)

抗血清が天蚕前幼虫の休眠覚醒に及ぼす影響						
注射した試料 (注射量)	N	昆 虫 の 数			休眠覚醒率 (%)	
		休眠	休眠 覚醒	死亡		
前血清						
0.1 $\mu$ l	10×3	30	0	0	0	
0.2 $\mu$ l	10×3	30	0	0	0	
抗血清						
0.1 $\mu$ l	10×3	27	3	0	10.0	
0.2 $\mu$ l	10×3	19	11	0	36.7	

表 3 から明らかなように、対照区の前血清を注射した場合では、0.1  $\mu$ l、0.2  $\mu$ l とともに休眠覚醒した前幼虫は確認されず、すべて休眠したままであった。しかし、抗血清を注射した場合、0.1  $\mu$ l では 10%、0.2  $\mu$ l では約 37% も休眠覚醒することができ、抗血清の増加と共に休眠覚醒率が上昇した。これらの結果は、本発明のペプチドが、生体内で休眠の維持を制御する物質であるこ

とを証明するものである。図8 (A) は、 $0.2 \mu\text{l}$  の前血清を注射した天蚕前幼虫で、休眠継続の状態を示す写真であり、図8 (B) は、 $0.2 \mu\text{l}$  の抗血清を注射した天蚕前幼虫で、休眠覚醒の状態を示す写真である。以上の表3および図8 (A)、(B) の結果から、構造決定した本発明のペプチドは、天蚕の前幼虫体内で休眠の維持を制御している因子であることが実証できた。

(実施例6) ペンタペプチドによるラット肝ガン細胞(dRLh84)の増殖制御効果：

ガン細胞の増殖に及ぼすペンタペプチドの制御効果を次のようにして調べた。ガン細胞としては、比較的簡単に入手し易く、しかも細胞培養が容易であるラット肝ガン細胞(dRLh84)を用いた。本発明の生理活性物質(RF-NH<sub>2</sub>)とガン細胞増殖の関係を明らかにするために、対照区として、細胞培地にPBS(-)を添加したもの、実験区として、細胞培地に上記C末端がアミド化されているタイプのRF-NH<sub>2</sub>およびC末端が遊離酸化されているRF-COOHを、それぞれ、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$  添加したものをを用いて培養を行った。培養細胞数を $3 \sim 5 \times 10^5$ 個に調整し、所定量の各ペプチドを添加し、または添加しないで、5% CO<sub>2</sub>の存在下、37℃で培養した。培養24時間後と48時間後の培養液について、ガン細胞の形態的な観察を倒立顕微鏡下で直接行った。この顕微鏡写真を図9に示す。

図9から明らかなように、RF-NH<sub>2</sub>を添加した実験区では、24時間後および48時間後とも、培養開始時点(0時間)の細胞数と比較しても増加はほとんどなく、しかも48時間後には細胞の形態が紡錘形から丸形に変化していた。このような細胞の形態変化は、細胞が分裂活動の状態から分裂活動の停止状態へと変化したことを意味する。一方、対照区およびRF-COOHを添加した実験区では、24時間後および48時間後とも、培養開始時点の細胞数と比較して極めて顕著に増加していた。図9の結果は、本発明における生理活性物質を培養細胞に添加することによって、ラットのガン細胞の増殖が形態的に制御されることを意味している。

(実施例7) ペンタペプチド濃度によるラット肝ガン細胞(dRLh84)の増殖制御効果：

$3 \times 10^4$ 個のdRLh84ラット肝ガン細胞に対し所定の濃度(0、50、100、150、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ )となるようにペプチド(DILRG-NH<sub>2</sub>またはDILRG-COOH)を細胞培地に添加し、5% CO<sub>2</sub>存在下、37℃で40時間培養した。その後トリパ



ンブルで処理し生細胞数を計測した。得られた結果を図10に示す。

図10から明らかなように、実験区のRF-COOHの場合、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度でも生細胞数は $14.6 \times 10^5$ 個のレベルで増殖活性にほとんど変化は認められない。しかし、RF-NH<sub>2</sub>添加区では、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度から生細胞数は顕著に減少し、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度では対照区の約半分の生細胞数に当たる $7.7 \times 10^5$ 個のレベルまで減少した。図10から、実施例6において形態的に観察したRF-NH<sub>2</sub>によるガン細胞増殖制御が生細胞数の減少と符合することがわかる。また、本発明における生理活性物質でC末端がアミド化されたペプチドには、顕著なガン細胞の増殖制御効果があるが、C末端が遊離酸化されているタイプのペプチドにおいては制御効果がまったく発現しなかったことがわかる。

(実施例8) ラット肝ガン細胞(dRLh84)増殖能力と培養時間との関係：

実施例6と7の結果から、昆虫の生理活性物質がラット肝ガン細胞の増殖を制御することが明らかになった。そこで、本発明の生理活性物質を用いてガン細胞の増殖能力と培養時間との関係を検討するために、培養時間を延長して培養を行った。培養法としては、実施例7と同様の方法で行った。培養時間は72時間まで延長し、対照区としてはPBS(-)を使用し、また、実験区としては、 $3 \times 10^5$ 個の細胞に対し濃度が $200\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにペプチド(DILRG-NH<sub>2</sub>)を細胞培地に添加し、5%CO<sub>2</sub>存在下、37℃で24、48、72時間それぞれ培養した。その後、トリパンブルーで処理して生細胞数を計測した。得られた結果を図11に示す。

図11から明らかなように、細胞数が、対照区では培養後72時間まで培養時間が増すに従って急激に増殖し、生細胞数が $3 \times 10^5$ 個から $60 \times 10^5$ 個まで20倍以上にも増大した。一方、実験区では72時間の間に細胞数が $3 \times 10^5$ 個から $8 \times 10^5$ 個と2.7倍の増加を示したに過ぎなかった。この結果は、本発明の生理活性物質がガン細胞増殖能力を7.5分の1レベルに制御することを意味するものである。すなわち、本発明の生理活性物質は、ガン細胞増殖能を、かなりのレベルで制御する効果を発揮していることが明らかである。

次いで、上記ペプチド添加培地の培養後48時間の培養液から培養細胞だけを新鮮な培地に移し変えて、上記と同じ培養条件で培養し、その後のガン細胞の増

殖量変化を調べた。その結果、増殖が一旦制御されていたガン細胞は、対照区のPBS(-)添加の場合と同様に急速に増殖を開始した。従って、このことは、ガン細胞制御のためには本発明のペプチドの存在が常時不可欠であること、さらに、このペプチドによりあらゆる生物の細胞増殖を可逆的に制御できることを示唆するものである。

(実施例9) ペプチド添加による細胞周期変化の解析：

実施例6、7、および8(図9、10、および11)により、本発明の生理活性物質がラット肝ガン細胞の増殖能力を制御することは実証できた。次に、その制御のメカニズムを検討することにした。濃度が $200\mu\text{g/ml}$ となるようにペプチド(DHLRG-NH<sub>2</sub>)を実施例6と同じ条件で培地に添加して、培養し、48時間培養した細胞をエタノール固定後、ヨウ化プロピジウム染色を行った。また、対照区としてPBS(-)を添加したものについても同様に処理した。細胞のDNA含量をフローサイトメーターを用いて解析した。得られた結果を図12(A)および(B)に示す。なお、この目的のために、フローサイトメトリー解析を使用するが、この方法は、DNA結合性の蛍光色素であるヨウ化プロピジウムで染色して、DNA含量を測定するものであり、細胞周期制御の解析が可能となる。すなわち、生物細胞は分裂しながらG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>、S(DNA複製期)、そしてM期(細胞分裂期)へと周期変化を起こしながら増殖する。図12(A)および(B)は個々のガン細胞のDNA量をフローサイトメーターを用いて測定し、解析したものである。図12(A)および(B)に示したように、PBS(-)添加の対照区(図12(A))とRF-NH<sub>2</sub>添加の実験区(図12(B))における細胞周期変化によれば、ペプチド添加および無添加により、ラット肝ガン細胞周期への影響パターンが異なることが推測された。

次に、図12(A)および(B)で見られたパターンを詳細に計測した。G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期では、DNA量は $2n$ であるのに対し、M期では2倍の $4n$ となる。図12(A)および(B)の解析で $2n$ のDNA量は360に、そして $4n$ のDNAはDNA量は700に対応したピークまたは幅広いピークに対応する。図12(A)および(B)に示す細胞周期変化の解析パターンがG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>、S、M期に特色のあるピークの線型結合からなると仮定し、それぞれの成分に分割する

ことにより各ステージの細胞の割合が求められる。得られた結果を表4に掲げる。

(表4)

各ステージの細胞の割合 (%)		
細胞周期ステージ	対照区 (PBS(-) 添加)	実験区 (DILRG - NH <sub>2</sub> 添加)
G 0 / G 1 期	5 0 . 5 3	6 6 . 0 7
S 期	3 7 . 5 5	2 1 . 8 4
G 2 / M 期	1 1 . 9 2	1 2 . 1 0

表4から明らかなように、細胞周期ステージのG 2 (有糸分裂準備期) とM期 (細胞分裂期) (表中では、G 2 / M 期に符合) の細胞割合は、対照区が1 1 . 9 2 %、実験区が1 2 . 1 0 %であり、両者ともほとんど変わらないが、G 0 期 (静止期) とG 1 期 (DNA複製決定期) (表中では、G 0 / G 1 期と符合) の細胞割合は、対照区が5 0 . 5 3 %であるのに対し、実験区が6 6 . 0 7 %であり、実験区の方が対照区より3割以上多かった。また、S期 (DNA複製期) の場合は逆に、対照区の3 7 . 5 5 %に対し、実験区は2 1 . 8 4 %であり、実験区の方が対照区より4割以上少なかった。従って、この結果は、本発明の生理活性物質が細胞周期のG 0 とG 1 の両ステージを増大させるように作用し、それによってS期が少なくなり、生細胞数の増殖が制御されたことを実証するものである。

(実施例10) 本発明の生理活性物質の構造と細胞増殖制御効果の関係：

実施例6、7、および8の結果から、昆虫の生理活性物質がラット肝ガン細胞に対して増殖制御効果を有することを明らかにすることができた。さらに、実施例9の結果から、そのメカニズムとして細胞周期を制御することで細胞増殖の制御を発現することを示すことができた。そこで、この物質の5個のアミノ酸配列のどの部分が構造的に不可欠であるか検討することにした。培養法としては、実施例6と同様の方法で行ったが、対照区としては、PBS(-)と、棘皮動物から昆虫および哺乳類までにわたって広範に存在する4個のアミノ酸から構成され、C末

端がアミド化されているFMRF-NH<sub>2</sub>とをそれぞれ使用した。実験区としては、 $2.6 \times 10^5$ 個の細胞に対して濃度が $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように完全合成ペプチド(DILRG-NH<sub>2</sub>)またはN末端のアスパラギン酸を欠いた不完全合成ペプチド(ILRG-NH<sub>2</sub>)を細胞培地に添加したものを使用した。対照区と実験区のそれぞれについて、5%CO<sub>2</sub>存在下、37℃で48時間培養した。その後、トリパンブルーで処理し生細胞数を計測した。得られた結果を図13に示す。

図13から明らかなように、対照区のPBS(-)やFMRF-NH<sub>2</sub>では、生細胞数は $19.1 \sim 19.7 \times 10^5$ 個のレベルであり、完全合成ペプチドの場合には $7.7 \times 10^5$ 個であり、細胞数で1桁異なる増殖制御が確認された。また、N末端を欠いた不完全合成ペプチドの場合は、 $8.4 \times 10^5$ 個と完全合成ペプチドよりはやや増殖細胞数が多いが、十分な増殖制御効果が認められた。従って、増殖制御効果を発現するペプチドとしては、C末端がアミド化されていると共に、休眠制御物質のN末端のアスパラギン酸を欠いたILRGでも効果的であることを明らかにすることができた。この結果は、4個から5個のアミノ酸配列をリード化合物としながら将来強力な細胞増殖制御剤を開発するためにも重要な情報となり得る。

#### 産業上の利用の可能性

本発明の遺伝子Any-RFを有する休眠制御物質によれば、休眠中の前幼虫などに対して休眠覚醒させるように発育を運命づけたとしても、この休眠制御物質の投与により休眠覚醒を延長させたりまたは停止させたりすることができる。この休眠制御物質であるペプチドには、多様な生理活性と簡単な投与法が期待され得る。

本発明により昆虫休眠メカニズムの機構が明らかとなったので、休眠することが確認されている生物に対して本発明の休眠制御物質を適用することにより、これらの生物が休眠する本質である低エネルギー代謝の生命機構を解明することが可能となる。将来的には、長期わたって生命を維持せしめ得る物質の開発へと結びつき、最終的には長寿促進物質の開発のためのリード化合物ともなり得る。

また、本発明のペプチドは、低分子ペプチドであり、生体外から投与しても抗原抗体反応が起こり難く、しかも格別の発育制御活性を有していることから、こ

の構造そのままでも種々の休眠型生物に直接投与できる。特に高等動物においても、本ペプチドのような低分子ペプチドは抗原とはなり難いので、生体外からの合成ペプチドの投与によって、可能性のある機能について簡易に試験・研究ができるという利点がある。

本発明の生理活性物質であるペプチドは、5個のアミノ酸からなるペンタペプチド（分子量570.595）、または4個のアミノ酸からなるテトラペプチド（分子量456.58）であるため、蚕由来のセクロピン（分子量約4K）およびモンシロチョウ由来のピエリシン（分子量98K）と比較して、生体に投与しても抗原抗体反応が起こり難く、しかも抗ガン活性という特異的な機能を有しているため、抗ガン剤開発のリード化合物としても有望なものである。

これらの本発明のペプチドはそのままでも種々の動物に直接投与できる。すなわち、ヒトだけでなく、家畜などの高等動物に対しても、本ペプチドのような低分子ペプチドは抗原とはなり難いので、該ペプチドの生体外からの投与によって、抗ガン機能を発揮させることができるという利点を持っている。また、本発明のペプチドは、抗原抗体反応を起こすことのない細胞増殖制御効果のある新しい医薬となり得る。

本発明の遺伝子Any-RFを有する生理活性物質である低分子ペプチドは、副作用を伴わずに効率的にガン細胞の増殖を阻害する機能を持つので、ヒトの子宮ガン、肝臓ガン、肺ガン、胃ガン、乳ガンなどの細胞増殖を効率的に制御し、ひいては生体細胞の細胞制御を効率的に行うことができる。この生理活性物質は、ガン細胞の生細胞を増加させない機能（図9、図10、および図11）を持つとともに、生存するガン細胞に対して、ガン細胞の周期ステージを変化させ、一旦休止状態にさせる点に大きな特徴がある。この点において従来の如何なる抗ガン剤の作用機序とも異なっており、医薬品として極めて有用である。すなわち、本発明の生理活性物質は、DNA複製期に相当するS期を減少させ、静止期のG0ならびに第1期に符合するG1期を延長させる機能を持つ。これに対し、セクロピンにしるピエリシンにしる、ガン細胞でアポトーシス（細胞死）を誘導し、その結果、ガン細胞の増殖を阻害しているに過ぎない。かくして、本発明の生理活性物質は、上記セクロピンやピエリシンを含めた従来の抗ガン剤が持つ正常細胞へ

のアポトーシス問題を解消し、静止期にある多くの正常細胞へは影響もなく、増殖細胞だけを制御するという優れた働きを持ち、ガン細胞の増殖を効率的に阻害する。

一般に、分化成熟した正常細胞のG 0期とG 1期が最も長い時間を要するといわれている。しかし、ガン細胞のG 0期とG 1期は短時間である。その両ステージを増大するように作用する本発明の生理活性物質は、従来報告されている昆虫由来のガン細胞制御効果物質とは根本的に異なっている。従来のものはアポトーシスに伴う核の凝縮や断片化を誘導し、その結果、生細胞数を減少せしめるものである。しかし、本発明の生理活性物質の機能は、細胞周期のG 0とG 1を増大しS期を減少させ、その結果、生細胞の細胞周期が長時間となり、最終的には増殖を制御することにある。従って、本発明の生理活性物質は、ガン細胞増殖において細胞死を誘導するのではなく、細胞周期を制御し細胞の増殖を制御することで細胞数が増えないように作用している。

本発明の生理活性物質は、上記したように、生理活性機能の一つとして、天蚕前幼虫の休眠を長く維持するように作用する。一般に生物の休眠とは、細胞の増殖が停止し低エネルギー状態を維持することが特徴と考えられている。従って、この物質の機能を多面的に応用する一例として、哺乳類のガン細胞増殖を制御する目的においても活用できる。さらに、多くの生物細胞の増殖を抑えると考えられるので、細胞レベル・個体レベルでの培養細胞の長期保存剤としても利用できる。

## 請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列、Asp-Ile-Leu-Arg-Glyを有し、C末端がアミド化されており、分子量が570.959であるタンパク質をコードする遺伝子Any-RF。
2. 前記タンパク質が休眠制御活性を有するものである請求項 1 記載の遺伝子Any-RF。
3. 前記タンパク質が天蚕の前幼虫由来のものである請求項 1 または 2 記載の遺伝子Any-RF。
4. 配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列、Asp-Ile-Leu-Arg-Glyを有し、C末端がアミド化されており、分子量が570.959であって、休眠制御活性を有することを特徴とする休眠制御物質。
5. 前記休眠制御物質が天蚕の前幼虫由来のものである請求項 4 記載の休眠制御物質。
6. 昆虫の前幼虫体を粉碎したものに、メタノール：水：酢酸からなる酸メタノール液を加え、摩砕後、遠心処理し、得られた上清を逆相高速液体クロマトグラフィおよび混合分離モード高速液体クロマトグラフィに導入することにより、配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列、Asp-Ile-Leu-Arg-Glyを有し、かつC末端がアミド化されており、分子量が570.959である休眠制御物質を得ることを特徴とする休眠制御物質の製造方法。
7. 配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列、Asp-Ile-Leu-Arg-Glyを有し、C末端がアミド化されており、分子量が570.959であるペプチドを有効成分として含有する生体細胞の細胞制御剤。
8. 前記細胞制御剤がガン細胞増殖制御剤である請求項 7 記載の生体細胞の細胞制御剤。
9. 前記ペプチドが天蚕の前幼虫由来のものである請求項 7 または 8 記載の生体細胞の細胞制御剤。
10. 配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列からN末端のAspを欠いたアミノ酸配

列、Ile-Leu-Arg-Glyを有し、C末端がアミド化されており、分子量が456.58であるペプチドを有効成分として含有する生体細胞の細胞制御剤。

11. 前記細胞制御剤がガン細胞増殖制御剤である請求項10記載の生体細胞の細胞制御剤。

12. 前記ペプチドが天蚕の前幼虫由来のものである請求項10または11記載の生体細胞の細胞制御剤。

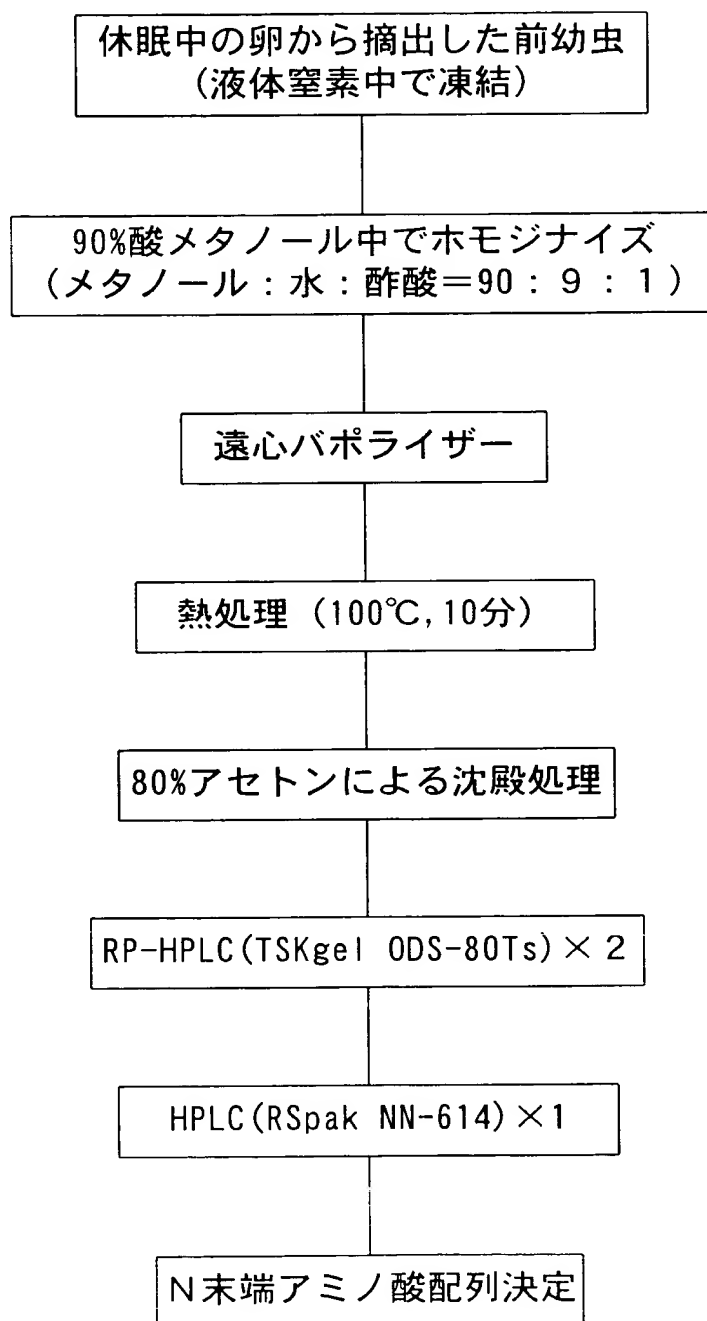


## 要約書

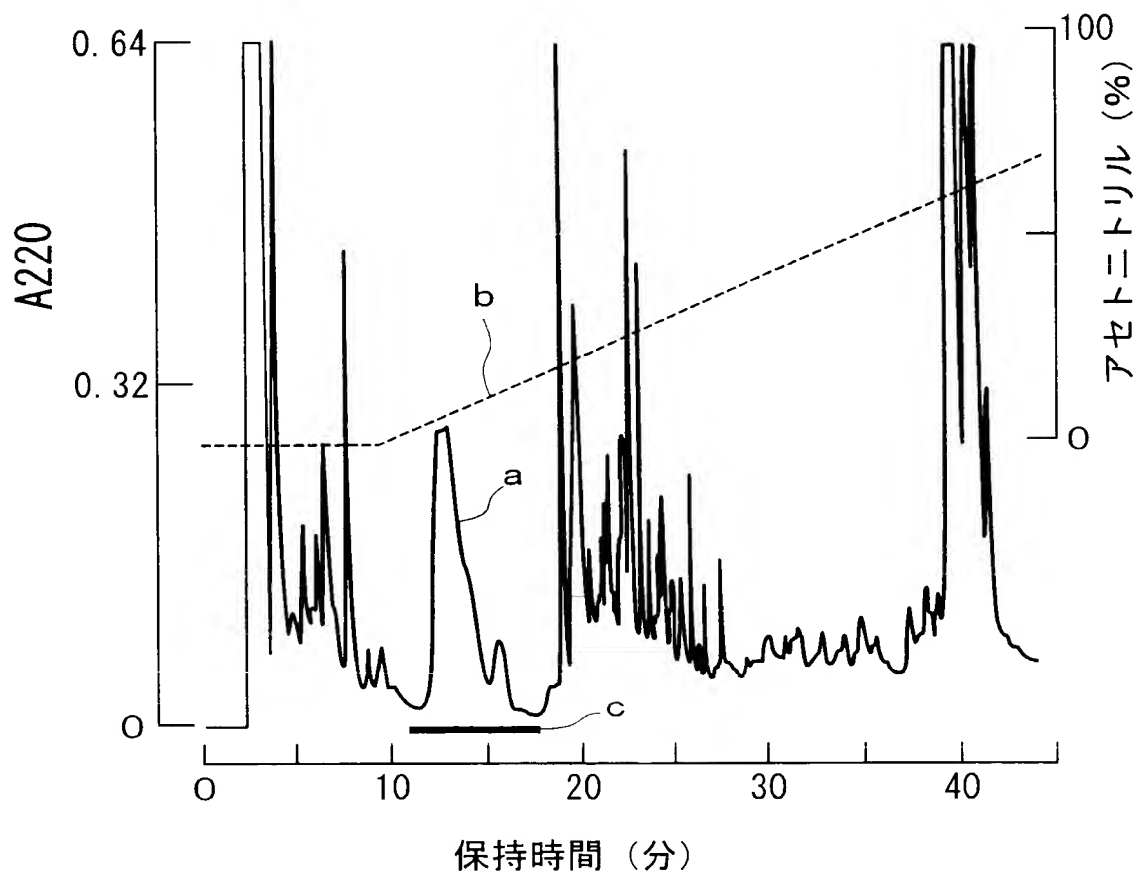
本発明は、昆虫由来の休眠制御活性を有しかつ生体細胞制御機能を有する遺伝子Any-RF、休眠制御物質およびその製造方法、ならびに生体細胞の細胞制御機能を持ち、生体内で抗原抗体反応を起こさない生理活性物質を有効成分とする生体細胞の細胞制御剤を提供する。

配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列、Asp-Ile-Leu-Arg-Glyを有し、C末端がアミド化されており、分子量が570,959であるタンパク質をコードする。かかる遺伝子を有する生理活性物質は、天蚕に酸メタノール水溶液を加え、磨砕後、遠心処理し、HPLCシステムによる処理を経て単離、精製して得ることができるペプチドであり、昆虫などの休眠を制御することができるとともに、かかるペプチドを有効成分として含有する生体細胞の細胞制御剤として有用である。

【図 1】

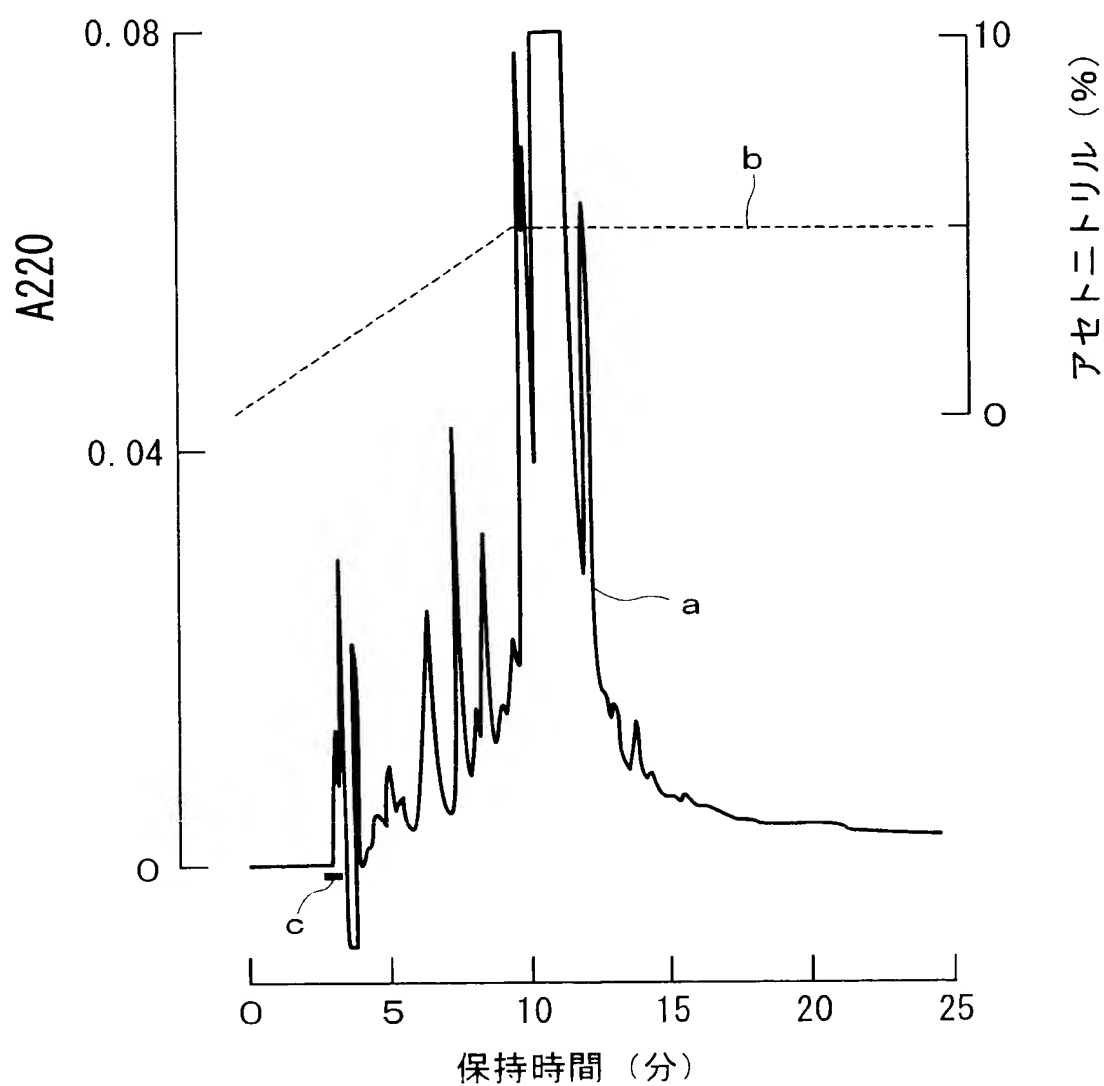


【図 2】



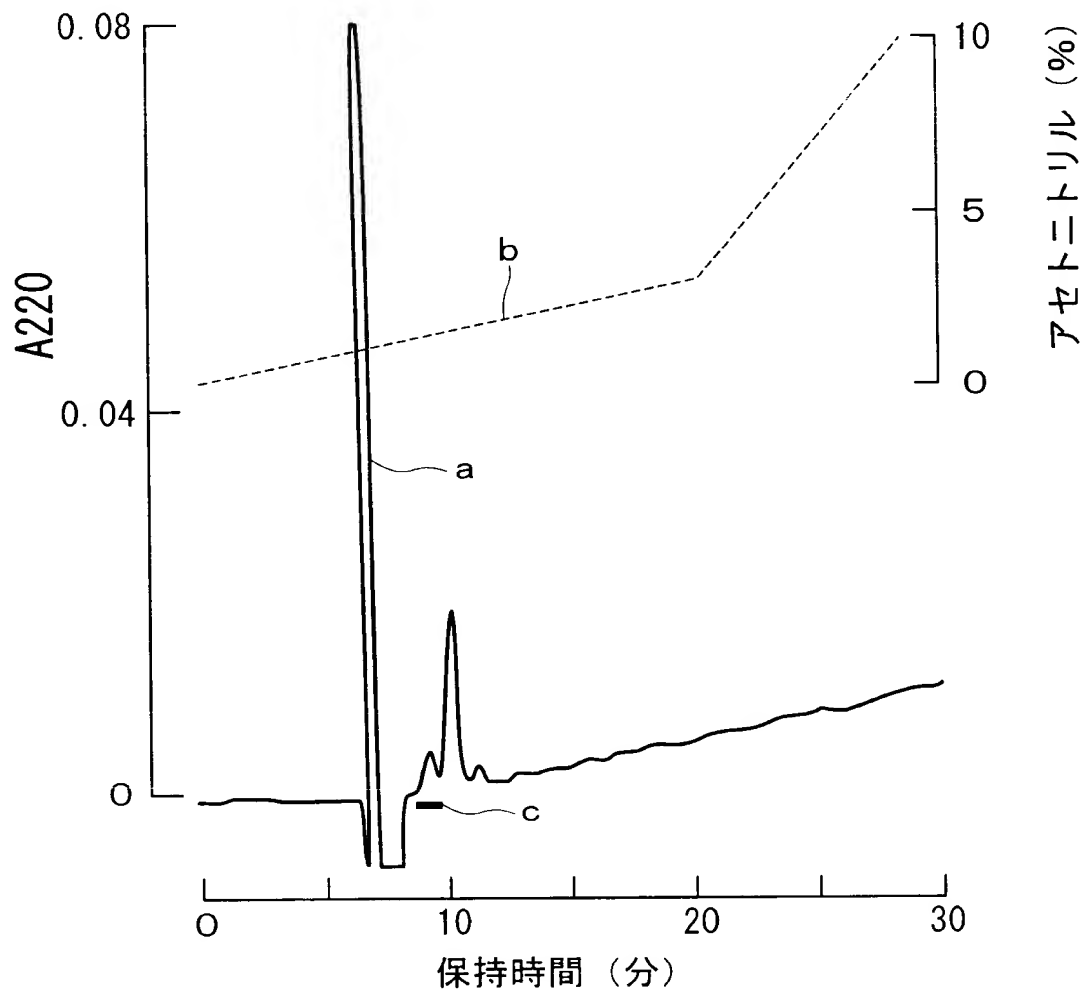
- a : 80%アセトン沈殿のTSKgel ODS-80Ts  
カラムによる逆相HPLCパターン
- b : 0.1%TFA水溶液中におけるアセトニトリル濃度
- c : 抑制因子の活性画分

【図 3】



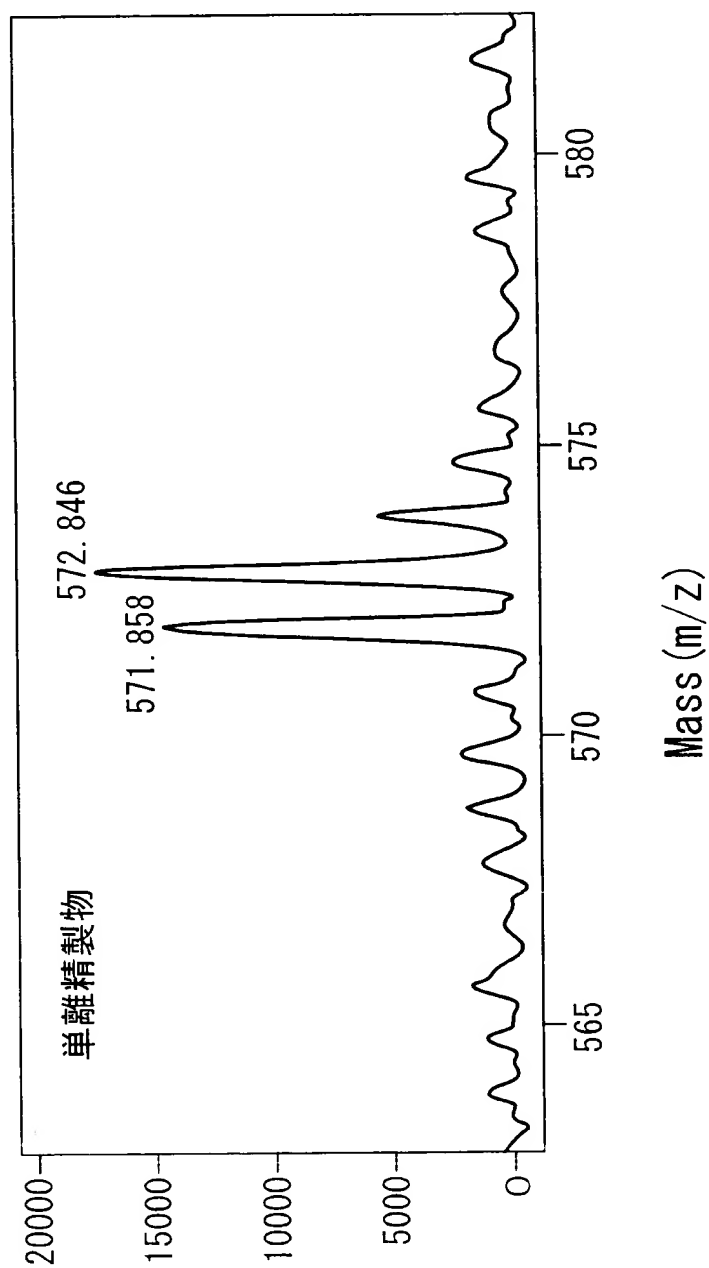
- a : 第 1 回HPLC (図 2) によって得られた活性画分の  
TSKgel ODS-80Tsカラムによる逆相HPLCパターン
- b : 0.1%TFA水溶液中におけるアセトニトリル濃度
- c : 抑制因子の活性画分

【図 4】

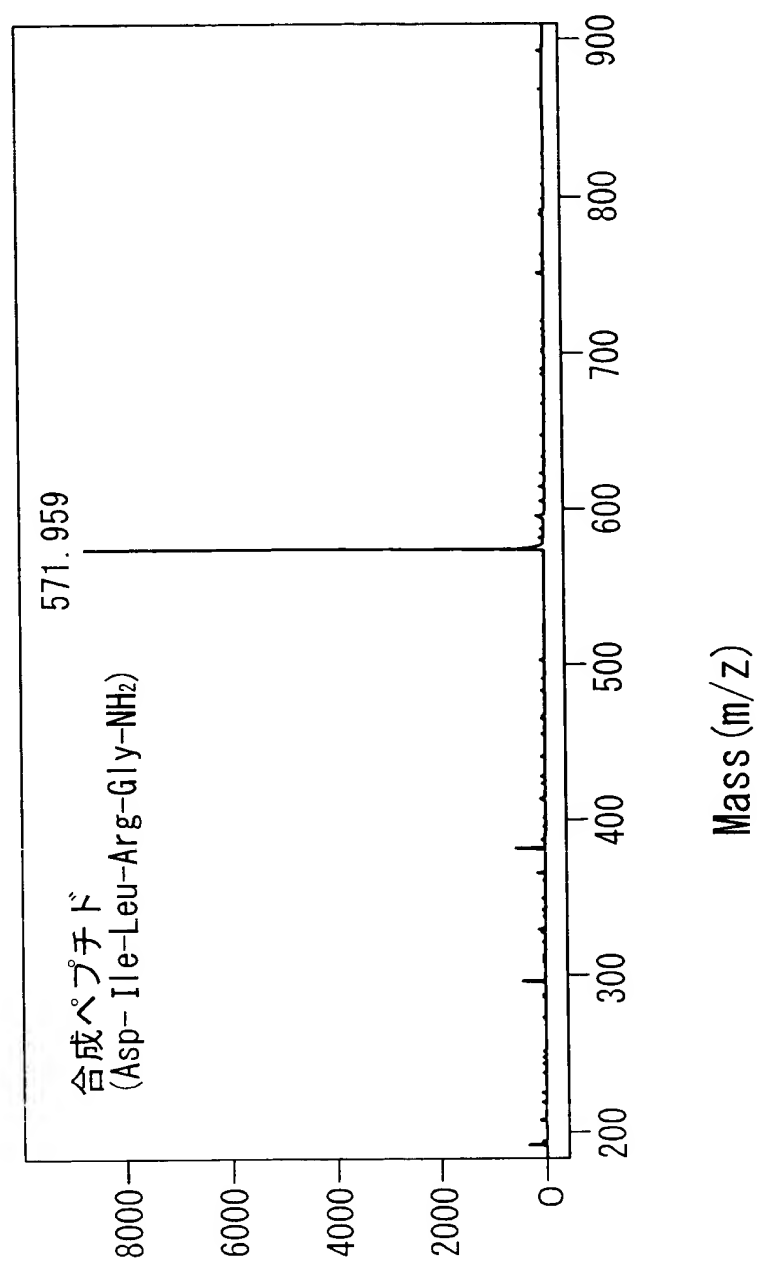


- a : 第 2 回 HPLC (図 3) によって得られた活性画分の  
RSpak NN-614 カラムによる HPLC パターン
- b : 0.1% TFA 水溶液中におけるアセトニトリル濃度
- c : 抑制因子の活性画分

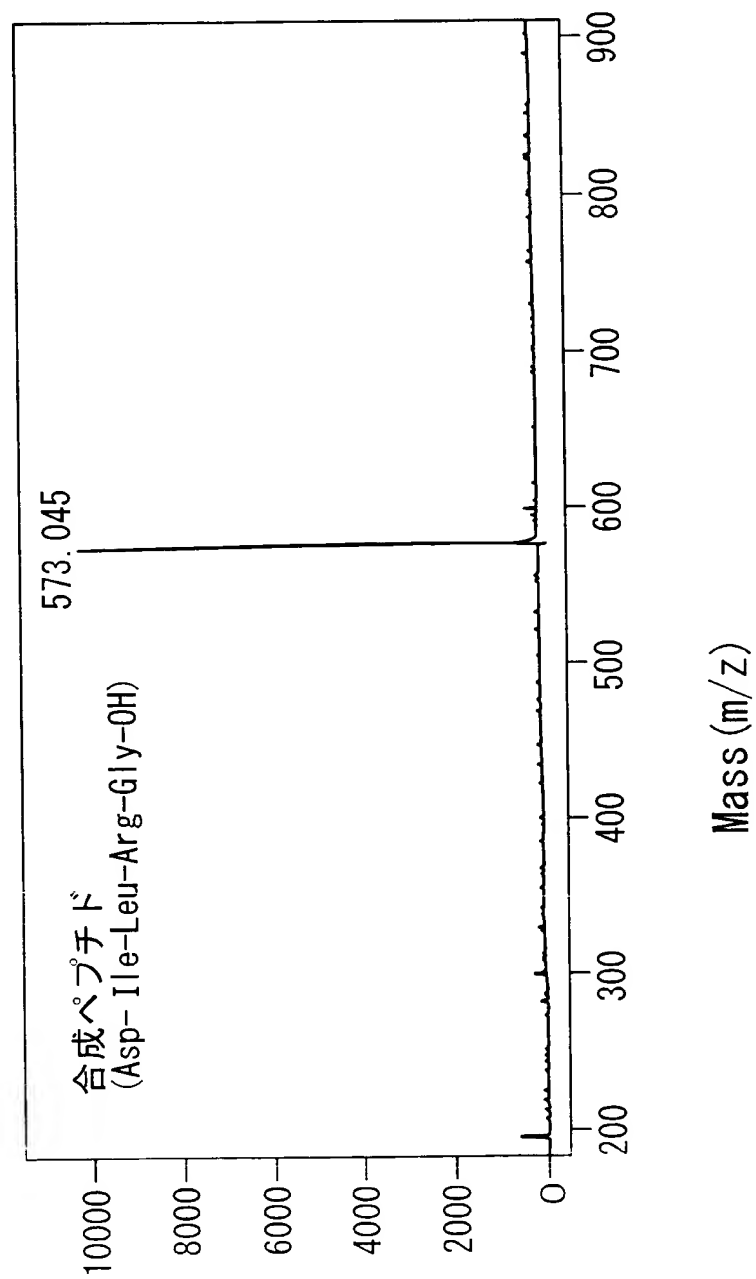
【図5】



【図6】

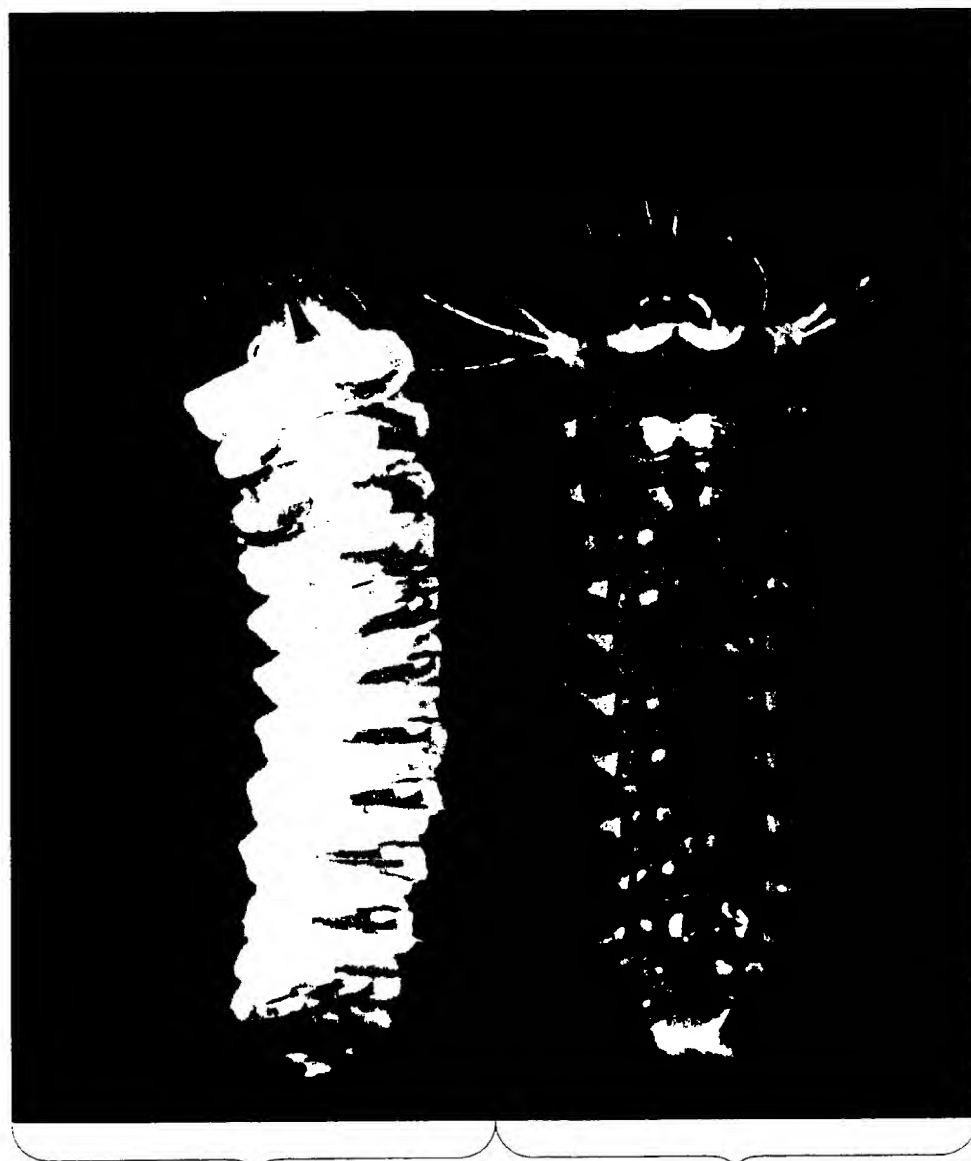


【図7】





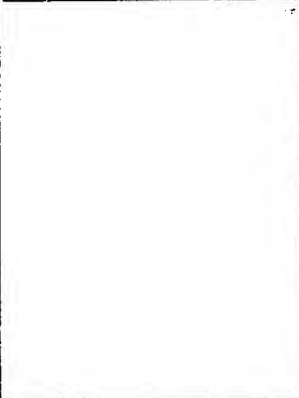








【図8】



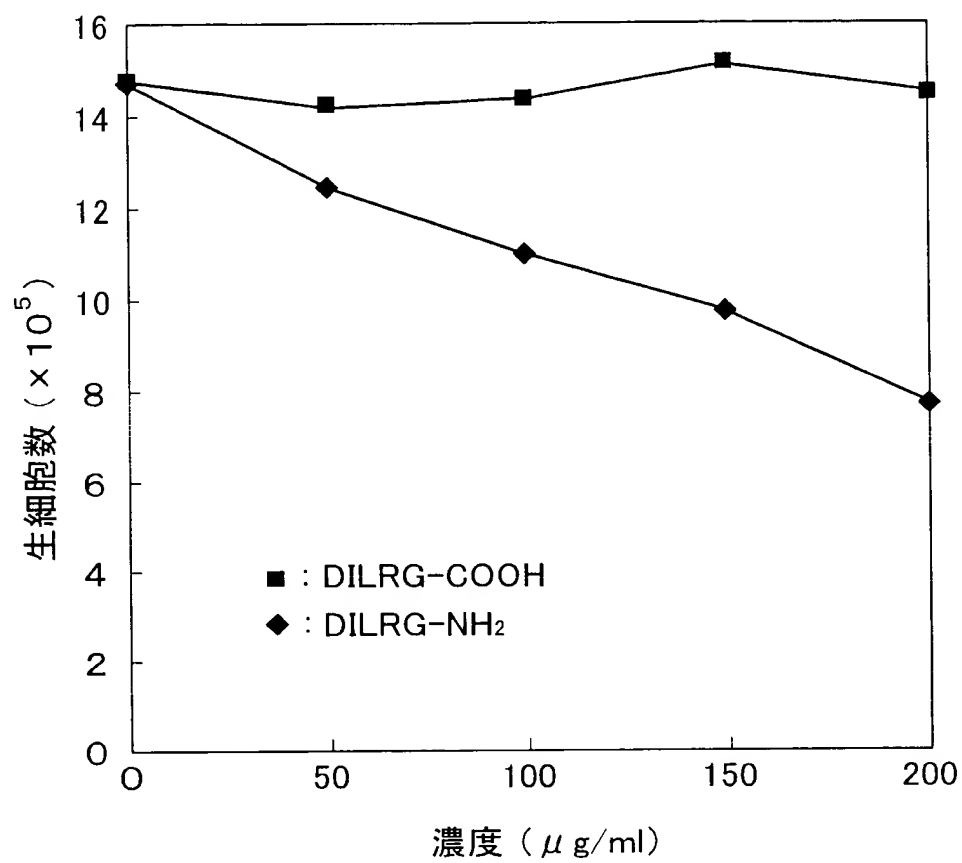
(A)

(B)

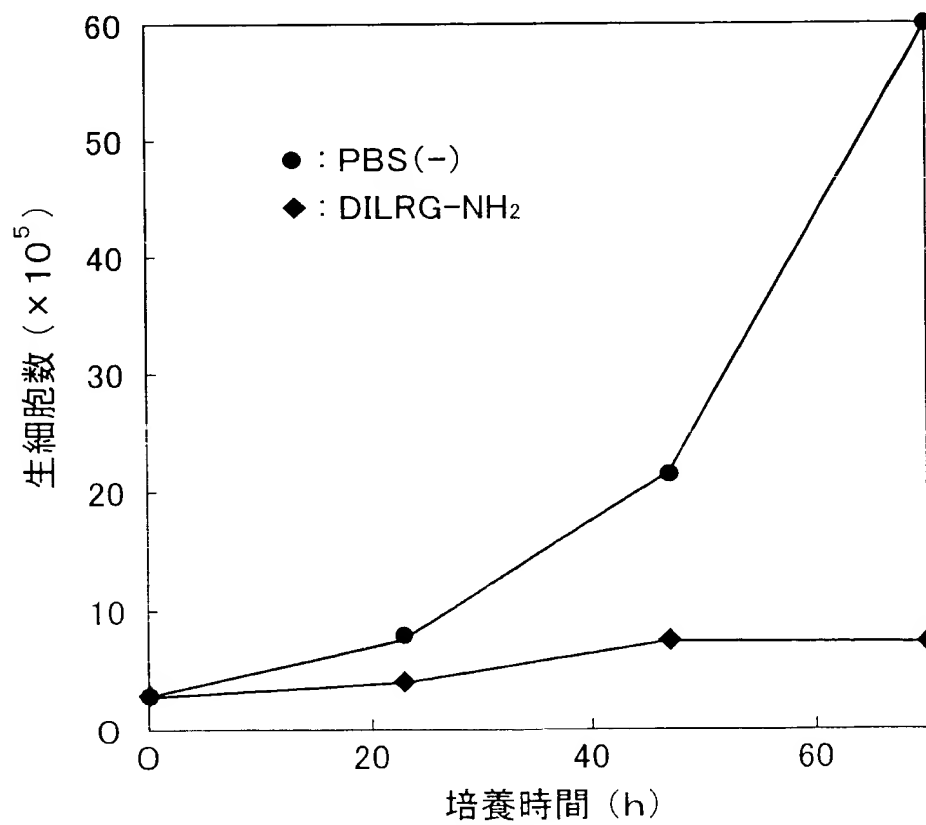
【図9】

培養時間 区	0 時間	24 時間	48 時間
実験区 (RF-COOH)			
対照区 ((-)) (PBS)			
実験区 (RF-NH2)			

【図10】

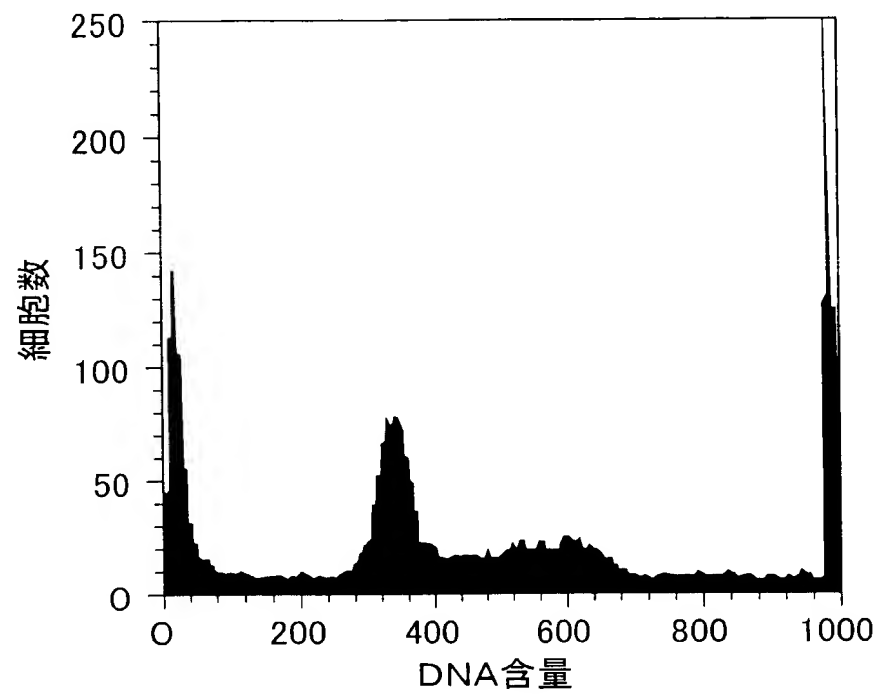


【図11】

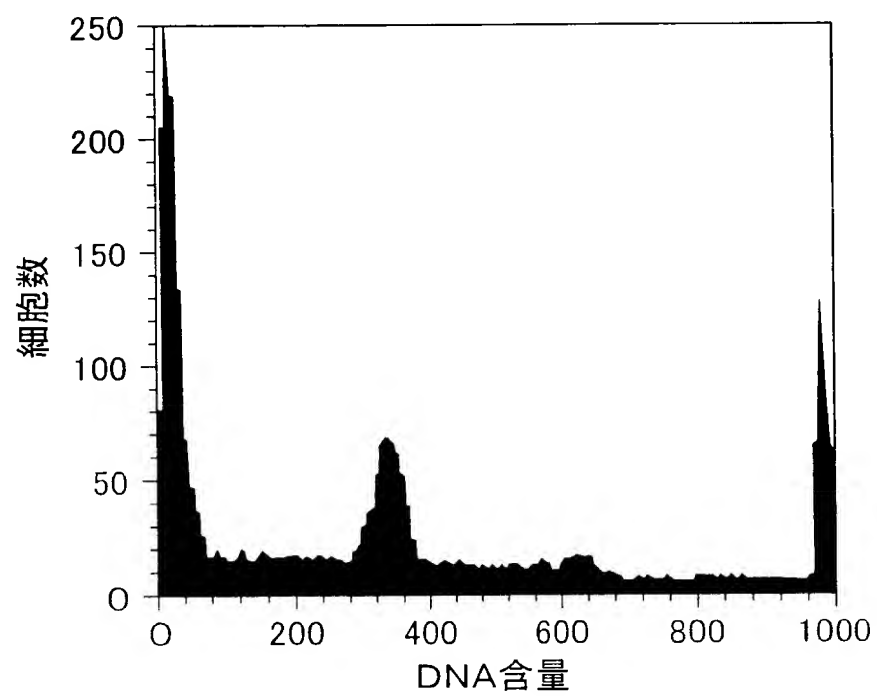


【図12】

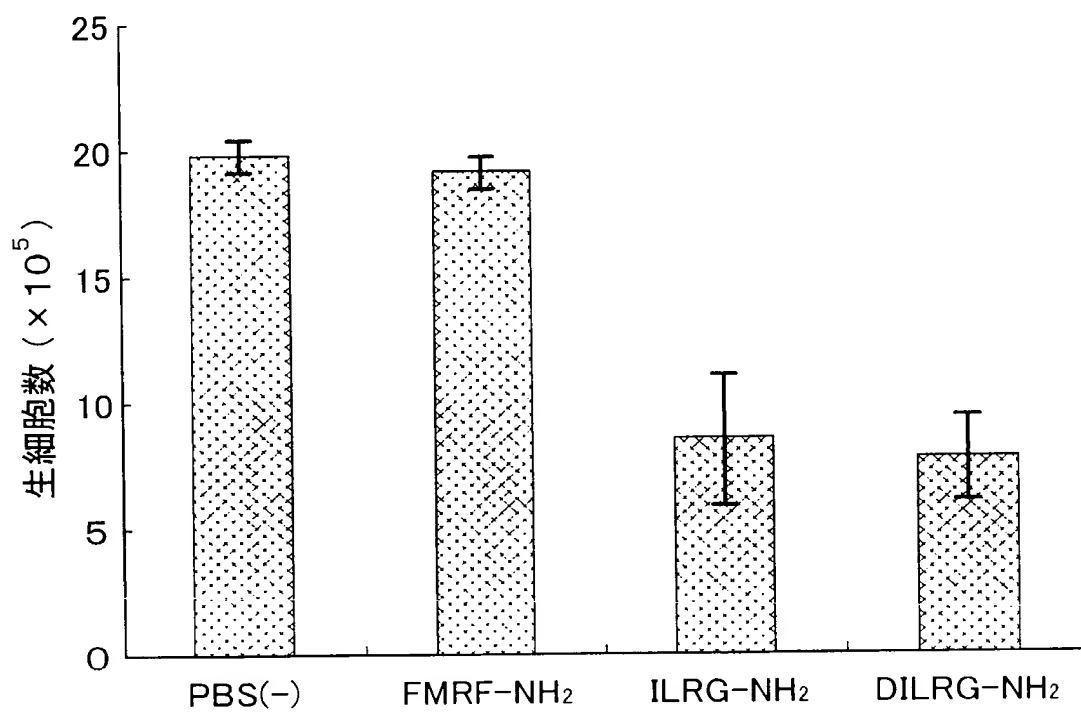
(A)



(B)



【図13】



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年05月26日（26. 05. 2000）金曜日 11時05分09秒

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	この特許協力条約に基づく国際出願願書(様式 - PCT/R0/101)は、右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.84 (updated 01. 06. 1999)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (R0/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	20622
I	発明の名称	遺伝子Any-RF、休眠制御物質およびその製造方法、ならびに生体細胞の細胞制御剤
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人である。	農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長が代表する日本国
II-4ja	名称	JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF SERICULTURAL AND ENTOMOLOGICAL SCIENCE, MINISTRY OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES
II-4en	Name	305-0851 日本国 茨城県 つくば市 大わし 1-2 Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0851 Japan
II-5ja	あて名:	以後は、ここにカンマを入れること。 坂下
II-5en	Address:	
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
II-8	電話番号	0298-38-6026
II-9	ファクシミリ番号	0298-38-6028

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年05月26日 (26. 05. 2000) 金曜日 11時05分09秒

III-1 III-1-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	
III-1-4ja III-1-4en III-1-5ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	小瀧 豊美 KOTAKI, Toyomi 300-2521 日本国 茨城県 水海道市 大生郷町 2 6 0 2 - 9
III-1-5en	Address:	2602-9, Ohnogo-machi, Mitsukaido-shi, Ibaraki 300-2521 Japan
III-1-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-1-7	住所(国名)	日本国 JP
III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	
III-2-4ja III-2-4en III-2-5ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	塚田 益裕 TSUKADA, Masuhiro 305-0035 日本国 茨城県 つくば市 松代 4 - 2 5 - 4 0 1 - 4 0 3
III-2-5en	Address:	25-401-403, Matsushiro 4-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0035 Japan
III-2-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-2-7	住所(国名)	日本国 JP
III-3 III-3-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	
III-3-4ja III-3-4en III-3-5ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	鈴木 幸一 SUZUKI, Koichi 020-0834 日本国 岩手県 盛岡市 永井 2 3 - 3 2 - 2 3
III-3-5en	Address:	23-32-23, Nagai, Morioka-shi, Iwate 020-0834 Japan
III-3-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-3-7	住所(国名)	日本国 JP

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年05月26日 (26. 05. 2000) 金曜日 11時05分09秒

III-4 III-4-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-4-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-4-4ja III-4-4en III-4-5ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	楊 平 YANG, Ping 020-0133 日本国 岩手県 盛岡市 青山 2-6-20-301 6-20-301, Aoyama 2-chome, Morioka-shi, Iwate 020-0133 Japan
III-4-5en	Address:	
III-4-6	国籍(国名)	中華人民共和国 CN
III-4-7	住所(国名)	日本国 JP
IV-1 IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	代理人 (agent)  北村 欣一 KITAMURA, Kinichi 105-0004 日本国 東京都 港区 新橋 2-16-1 ニュー新橋ビル 703 703 New Shinbashi Building, 16-1, Shinbashi 2-chome, Minato-ku, Tokyo 105-0004 Japan
IV-1-2en	Address:	
IV-1-3 IV-1-4	電話番号 ファクシミリ番号	03-3503-7811 03-3595-1585
IV-2 IV-2-1ja IV-2-1en	その他の代理人  氏名 Name(s)	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent) 町田 悦夫; 打揚 洋次 MACHIDA, Etsuo; UCHIAGE, Yohji
V V-1	国の指定 広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	EP: DE FR GB
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	CA US



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年05月26日（26. 05. 2000）金曜日 11時05分09秒

V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。		
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張		
VI-1-1	先の出願日	1999年05月31日 (31. 05. 1999)	
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-152273号	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VI-2	先の国内出願に基づく優先権主張		
VI-2-1	先の出願日	2000年03月22日 (22. 03. 2000)	
VI-2-2	先の出願番号	特願2000-81012	
VI-2-3	国名	日本国 JP	
VI-3	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1, VI-2	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	6	-
VIII-2	明細書（配列表を除く）	36	-
VIII-3	請求の範囲	2	-
VIII-4	要約	1	20622. txt
VIII-5	図面	12	-
VIII-6	明細書の配列表	1	-
VIII-7	合計	58	

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年05月26日 (26. 05. 2000) 金曜日 11時05分09秒

	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-9	別個の記名押印された委任状	✓	-
VIII-15	計算機読取可能な媒体によるマルチメディア及び/又はアミノ酸配列リスト		別個のフレキシブルディスク
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振込を証明する書面	-
VIII-17	その他	陳述書	-
VIII-17	その他	フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)	北村 欣一	
IX-2	提出者の記名押印		
IX-2-1	氏名(姓名)	町田 悦夫	
IX-3	提出者の記名押印		
IX-3-1	氏名(姓名)	打掃 洋次	

## 受理官庁記入欄

T0-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
T0-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
T0-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
T0-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
T0-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
T0-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年05月26日（26. 05. 2000） 金曜日 11時05分09秒

## 国際事務局記入欄

TI-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--